Synthese und Abbau von Leucinpeptiden

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der
Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Ulrich Weber
aus Tübingen

1964

7944

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547602_0085

Synthese und Abbau von Leucinpeptiden

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der
Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Ulrich Weber
aus Tübingen

1964

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Juli 1964

Dekan: Professor Dr. Peter Roquette

1. Berichterstatter: Professor Dr.Dr. Günther Weitzel

2. Berichterstatter: Professor Dr. Ernst Bayer

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Diese Arbeit wurde auf Veranlassung und unter der Leitung von Herrn

Professor Dr.Dr. G ü n t h e r W e i t z e l

im Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen ausgeführt.

Ich danke meinem Lehrer für die Überlassung des Themas und großzügige Förderung dieser Arbeit.

Ferner danke ich Herrn Dozent Dr. Friedhelm Schneider für viele wertvolle Anregungen und Frau Dr. Anna-Maria Fretzdorff und Frl. Eva Brintzinger für Ausführung von Analysen.

Inhaltsverzeichnis

I Einleitung und Fragestellung.....1

II Zur Darstellung der Peptide

1. Verknüpfungsmethoden und Schutzgruppen.....3

2. Zur Darstellung der einzelnen Peptide.....5

III Enzymatische Abbauversuche.....9

IV Diskussion der enzymatischen Abbauversuche...21

V Hydrolyse mit 10n Salzsäure.....32

VI Diskussion des HCl-Abbaus.....35

VII Experimenteller Teil

1. Allgemeine Synthesen.....39

2. Synthesen der einzelnen Peptide.....46

3. Enzymatische Abbauversuche.....79

4. Chromatographie.....80

VIII Zusammenfassung.....81

IX Literaturverzeichnis.....82

Lebenslauf.....87

Abkürzungen

Leu = L-Leucin
D-Leu = D-Leucin
Gly = Glycin
His = L-Histidin
Val = L-Valin
Ser = L-Serin
Glu = L-Glutaminsäure
α-Glu = L-Glutaminsäure in α-Bindung
γ-Glu = L-Glutaminsäure in γ-Bindung
Phe = L-Phenylalanin

Cbo- = Carbobenzoxy-
Bz = -benzylester
pNP = p-Nitrophenylester
pNB = p-Nitrobenzylester
DCA = Dicyclohexylammoniumsalz
DCCI = Dicyclohexylcarbodiimid

Synthese und Abbau von Leucinpeptiden

I. Einleitung und Fragestellung

1907 fand Abderhalden (1,2), daß Blutserum proteolytische Aktivität gegenüber synthetischen Substraten besitzt. Gly-gly, Gly-gly-gly, Gly-leu und Leu-gly-gly wurden weitgehend gespalten. Er glaubte jedoch, die peptidspaltende Wirkung des Serums beruhe auf Fermenten, die während der Gerinnung aus Blutplättchen, Leukocyten und Erythrocyten frei werden. Noch 1925 schrieb C. Oppenheimer (3), normales Serum sei " einerseits frei von Fermenten, die Organeiweiß abbauen, andererseits von jeglicher Art von Peptidasen." Erst 1930 konnte Graßmann (4) eindeutig Peptidasen im Serum nachweisen. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß im Serum ein ganzes Spektrum von Peptidasen enthalten ist: Gly-gly-Dipeptidase (5), Gly-leu-Dipeptidase, Prolidase, Prolinase, Aminotripeptidase und Leucinaminopeptidase (6,7). Daneben sollen im Serum noch Angiotensinase (8) und Insulinase (9) spezifisch für den Abbau von Angiotensin bzw. Insulin vorkommen.

Es ist in der Tat erstaunlich, daß normales Blut eine solche Vielfalt von proteolytischen Enzymen enthält. Denn nicht nur die Bluteiweißkörper selbst, sondern auch zahlreiche Peptidhormone und andere Peptidwirkstoffe werden im Blut transportiert und sind dabei dem Angriff ebendieser Vielfalt von proteolytischen Enzymen ausgesetzt. Für Peptide wie Insulin, Glukagon, Oxytocin, Vasopressin, Angiotensin usw. ist aber sichergestellt, daß Abspaltung einer oder mehrer Aminosäuren vom Aminoende oder vom Carboxylende fast immer den restlosen Verlust der physiologischen Wirkung zur Folge hat. Wenn die Peptidhormone trotzdem über die Blutbahn un-

versehrt ihre Erfolgsorgane erreichen, müssen sie entweder durch besondere Mechanismen geschützt werden, oder aber das Bildungsorgan muß eine wesentlich größere Menge an Hormon ans Blut abgeben, als das Erfolgsorgan zu seiner normalen Funktion benötigt.

Als Schutzmechanismus kommt zunächst die Ausbildung von Sekundär- und Tertiärstrkturen in Frage, denn erfahrungsgemäß werden native Proteine z. B. von Aminopeptidasen wesentlich schwerer angegriffen als denaturierte Proteine. Da aber zumindest die kleineren Peptide wie Angiotensin (88) usw. sicher keine Sekundärstruktur besitzen, kann dieser Mechanismus nicht dafür verantwortlich sein, daß Peptidhormone im Blut nicht abgebaut werden.

Es ist jedoch bekannt, daß Aminopeptidasen, die vermutlich den größten Teil der proteolytischen Aktivität des Blutes ausmachen, verschiedene Peptide mit ganz unterschiedlicher Geschwindigkeit spalten, abhängig von der aminoendständigen Aminosäurekombination. Daher liegt die Annahme nahe, daß die endständigen Aminosäurekombinationen von serumstabilen Peptiden und Proteinen so gebaut sind, daß sie von den Peptidasen des Serums nur schwer oder gar nicht angegriffen werden.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Nachprüfung dieser Annahme. Es wurden dazu folgende Peptide synthetisiert:

Leu-his	Gly-gly-phe	ß-Ala-leu-leu
His-leu	Gly-gly-val	ß-Ala-leu-leu-leu
Leu-leu-his	Leu-leu-val	α-Glu-leu-leu
His-leu-leu	Val-leu-leu	α-Glu-leu-leu-leu
Leu-his-leu	Leu-val-leu	γ-Glu-leu-leu
His-his-leu	Ser-leu-leu	γ-Glu-leu-leu-leu
His-leu-his	D-leu-leu-leu	Gly-gly-leu-leu
	Leu-leu-D-leu	Gly-leu-leu-leu
		Leu-leu-leu-leu

Sämtliche hergestellten Peptide wurden in Abbauversuchen auf enzymatische Angreifbarkeit mit Serum und den folgenden Enzymen geprüft: Leucinaminopeptidase, Pepsin, Trypsin, Chymotrypsin, Papain, Ficin und Pronase. Zum Vergleich wurden alle Peptide auch mit 10n HCl abgebaut.

II Zur Darstellung der Peptide

1. Verknüpfungsmethoden und Schutzgruppen

Zur Knüpfung der Peptidbindung wurde hauptsächlich die Methode der gemischten Anhydride und aktivierte Ester, daneben in einigen Fällen die Azidmethode und die Sheehan-Methode mit DCCI verwendet.

Die Peptidsynthese mit p-Nitrophenylestern (12-15) ist ein sehr elegantes Verfahren. Es liefert die geschützten Peptide in sehr großer Reinheit und guter Ausbeute. Racemisierung tritt nicht ein, wenn man darauf achtet, daß das Reaktionsmedium kein überschüssiges Triäthylamin enthält. Seine Anwendbarkeit ist jedoch dadurch eingeschränkt, daß z.B. Histidin und Serin keine p-Nitrophenylester bilden.

Die Methode der gemischten Anhydride (16-19) hat den großen Vorteil, daß sie einfach und schnell durchzuführen ist und daß man die ungeschützten Aminosäuren als Natrium- oder Triäthylammoniumsalze einsetzen kann. Racemisierung ist jedoch auch beim Arbeiten in absol. Tetrahydrofuran nicht ganz auszuschließen. In wasserhaltigen Lösungsmitteln, die erforderlich sind, wenn man Salze von Aminosäuren einsetzt, bilden sich beträchtliche Mengen an Nebenprodukten.

Die Azidmethode ist sehr umständlich und zeitraubend, vor allem deshalb, weil man um 0° arbeiten muß, um eine Zersetzung des Azids zu vermeiden. Außerdem treten eine Menge Nebenreaktionen ein (20) und die Ausbeuten sind dementsprechend schlecht.

Die Sheehan-Methode ist wohl die einfachste und universell anwendbarste Methode, die man heute kennt. Die Lösungsmittel können weitgehend variiert werden, Racemisierung tritt praktisch nicht ein. Der entstehende Dicyclohexylharnstoff ist wohl in den meisten organischen Lösungsmitteln schwer löslich. Es ist jedoch manchmal recht schwierig, letzte Reste davon vom eigentlichen Reaktionsprodukt zu trennen.

Als Aminoschutzgruppe wurde ausschließlich der Cbo-Rest verwendet. Die Cbo-Schutzgruppe ist leicht einführbar und mit HBr/Eisessig oder katalytisch leicht wieder abspaltbar. Ihr einziger Nachteil ist, daß sie in bestimmten Fällen nicht alkalistabil ist, und zwar immer dann, wenn in einem geschützten Peptid an zweiter Stelle vom Aminoende aus gerechnet Glycin steht. Es tritt dann sehr leicht unter Abspaltung von Benzylalkohol Ringschluß zum Hydantoin ein (22).

Als Carboxylschutzgruppe bewährten sich neben Benzylestern ganz vorzüglich p-Nitrobenzylester. Sie kristallisieren sehr gut und lassen sich wesentlich leichter hydrieren als Benzylester (23,24), notfalls sogar ohne Zusatz von Eisessig, was bei der Darstellung von Histidinpeptiden von großem Vorteil ist (Histidinpeptide halten oft hartnäckig mehr oder weniger große Mengen Eisessig fest). Außerdem ist der p-Nitrobenzylrest gegenüber HBr/Eisessig wesentlich stabiler als der Benzylrest (23,24).

2. Zur Darstellung der einzelnen Peptide

a) Histidinhaltige Peptide

Zur Darstellung von Histidinpeptiden mit aminoendständigem Histidin kommt nur die Azidmethode in Frage, weil nur das entsprechende geschützte Hydrazid sich in genügender Reinheit und mit einigermaßen annehmbarer Ausbeute darstellen läßt (25,26). Alle Peptide mit aminoendständigem Histidin wurden dargestellt aus Cbo-histidinazid und den entsprechenden Aminosäure- bzw. Peptid-p-nitrobenzylestern (His-leu, His-leu-leu, His-leu-his). Die dazu benötigten Peptid-pNB (Leu-leu-pNB, His-leu-pNB, Leu-his-pNB) wurden aus den schön kristallinen Cbo-peptid-pNB durch Abspaltung des Cbo-Restes mit HBr/Eisessig als amorphe Pulver, im Falle des Leu-leu-pNB HBr als kristalline Substanz, erhalten.

Carboxylendständiges Histidin wurde als p-Nitrobenzylester meist über die p-Nitrophenylestermethode eingeführt (Leu-his, Leu-leu-his, His-leu-his, Gly-his, Gly-gly-his).

Geschütztes Leu-his-leu wurde aus Cbo-leu-pNP und His-leu-pNB gewonnen.

Sämtliche geschützten Peptide wurden in Methanol/Wasser ohne Zusatz von Eisessig hydriert. Sämtliche Peptide mit Ausnahme von Gly-his und Gly-gly-his wurden kristallin und chromatographisch rein erhalten.

Sowohl Cbo-gly-his-pNB als auch Cbo-gly-gly-his-pNB (beide kristallin, analysenrein und chromatographisch rein) lieferte beim Hydrieren in Methanol/Wasser eine ölige nicht kristallisierende Masse. Chromatographisch zeigte sich jeweils neben dem gesuchten Peptid in beträchtlichen Mengen eine unbekannte Verbindung, die offensichtlich bei der Hydrierung neben oder aus dem Peptid entstanden sein muß.

Zur Darstellung von Cbo-histidinhydrazid wurden größere Mengen Histidinmethylester 2HCl benötigt. Es gelang nun, diesen auf einfache Weise durch Veresterung von Histidin mit Thionylchlorid in Methanol darzustellen. Bei Anwendung von Thionylchlorid in 100% Überschuß war die Veresterung quantitativ. Das bedeutete einen wesentlichen Fortschritt gegenüber der üblichen Methode, die ein mehrtägiges Kochen des Histidins in absol. Methanol unter Durchleiten von HCl erforderte und auch dann noch nicht quantitativ verlief.

b) ß-Alaninhaltige Peptide

Aus Cbo-ß-ala und dem Triäthylammoniumsalz von Leu-leu bzw. Leu-leu-leu wurde nach der Mixed-Anhydrid-Methode in Tetrahydrofuran/Wasser Cbo-ß-ala-leu-leu bzw. Cbo-ß-ala-leu-leu-leu erhalten. Hydrieren der geschützten Verbindungen lieferte die kristallinen freien Peptide. ß-Ala-leu-leu wurde außerdem noch aus Cbo-ß-ala und Leu-leu-pNB und anschließende Hydrierung des Cbo-ß-ala-leu-leu-pNB in Methanol/Eisessig dargestellt.

c) Glutaminsäurehaltige Peptide

Die Darstellung von Peptiden mit aminoendständiger Glutaminsäure erfordert die Blockierung der Aminogruppe und einer Carboxylgruppe.

Aus Cbo-glu wurde zunächst das Anhydrid dargestellt und dieses mit Benzylalkohol umgesetzt. Dabei entstand ein Gemisch von Cbo-glu-α und γ-benzylester. Dieses Gemisch wurde getrennt durch fraktionnierte Extraktion mit verdünntem Ammoniak (etwas verschiedene Acidität von α- und γ-COOH) und jeweils überführt in die gut

kristallisierenden Dicyclohexylammoniumsalze (27,28). Die nach mehrmaligem Umkristallisieren reinen Dicyclohexylammoniumsalze des Cbo-glu-α bzw. γ-benzylesters wurden nun mit HCl in Essigester wieder in die freien Säuren überführt und dann mit Leu-leu-pNB bzw. Leu-leu-leu-pNB nach der Sheehan-Methode umgesetzt. Es wurde dabei kristalliner Cbo-glu-α bzw. γ-leu-leu-pNB und Cbo-glu-α bzw. γ-leu-leu-leu-pNB erhalten.

d) Valinhaltige Peptide

Vom Valin ließ sich glatt und in ausgezeichneten Ausbeuten das noch nicht beschriebene Val-pNB HBr darstellen. Durch Umsetzung mit Cbo-gly-gly-pNP bzw. mit Cbo-leu-leu nach der Sheehan-Methode wurde geschütztes Gly-gly-val bzw. Leu-leu-val erhalten.

Geschütztes Val-leu-leu wurde aus Cbo-val-pNP und Leu-leu-pNB dargestellt.

Zur Gewinnung von Leu-val-leu wurde zunächst Cbo-val-pNB mit Leu-pNB zum Cbo-val-leu-pNB umgesetzt. Abspaltung der Cbo-Gruppe mit HBr/Eisessig lieferte kristallines Val-leu-pNB HBr. Dieses wurde wiederum mit Leu-pNP zum geschützten Tripeptid umgesetzt.

e) Serinhaltige Peptide

Von Serin mit freier OH-Gruppe läßt sich weder ein p-Nitrophenylester darstellen, noch läßt es sich ohne geschützte OH-Gruppe bei den üblichen Peptidsynthesen einsetzen. Lediglich Cbo-serinhydrazid reagiert in der gewünschten Weise.

Aus Serinmethylester HCl wurde in ziemlich schlechter Ausbeute Cbo-serinhydrazid erhalten (29). Dieses wurde in das Azid überführt und mit Leu-leu-pNB umge-

setzt. Dabei entstand in relativ guter Ausbeute geschütztes Ser-leu-leu.

f) Peptide mit Phenylalanin

Phenylalanin wurde durch Veresterung mit Benzylalkohol und Benzolsulfonsäure in den Benzylester überführt. Dieser wurde mit Cbo-gly-gly-pNP zum geschützten Gly-gly-phe umgesetzt.

g) D-Leucinhaltige Peptide

Aus D-Leucin wurde zunächst Cbo-D-leu und daraus D-Leu-pNB HBr hergestellt. Umsetzung von Cbo-D-leu mit Leu-leu-pNB nach der Mixed-Anhydrid-Methode bzw. von Cbo-leu-leu mit D-Leu-pNB mit DCCI lieferte geschütztes D-Leu-leu-leu bzw. Leu-leu-D-leu.

h) Sonstige Peptide

Geschütztes Gly-gly-leu-leu und Gly-leu-leu-leu wurden aus Cbo-gly-gly-pNP und Leu-leu-pNB bzw. aus Cbo-gly-pNP und Leu-leu-leu-pNB erhalten. Leu-leu-leu-leu wurde auf ähnliche Weise über den p-Nitrobenzylester aus Cbo-leu-pNP und Leu-leu-leu-pNB hergestellt.

Sämtliche geschützten Peptide wurden, falls nicht anders vermerkt, in Methanol/Eisessig hydriert und sämtliche Peptide kristallin und chromatographisch rein erhalten.

III Enzymatische Abbauversuche

Abkürzungen:

o	=	nicht gespalten
+	=	bis 20% gespalten
++	=	bis 50% gespalten
+++	=	bis 80% gespalten
++++	=	vollständig gespalten

1. Abbau mit Serum

Peptid	5 Min.	15Min.	60Min.	5 Std.	20Std.
Leu-gly	+	++	+++	++++	
Gly-leu	+	++	+++	++++	
Leu-leu	+	++	+++	++++	
Leu-gly-gly	++	+++	++++		
Gly-gly-leu	+	++	+++	++++	
Gly-gly-phe	+	++	+++	++++	
Gly-gly-val	+	++	+++	++++	
Gly-leu-gly	+	++	+++	++++	
Leu-leu-gly	+	++	+++	++++	
Gly-leu-leu	+	+	++	+++	++++
Leu-gly-leu	+	+	++	+++	++++
Leu-leu-leu	+	++	+++	++++	
Leu-leu-leu-leu (x)	+	+	++	++	+++
Gly-gly-leu-leu	+	++	++	+++	++++
Gly-leu-leu-leu (x)	+	+	++	++	+++
Leu-leu-val	+	++	++	+++	++++
Val-leu-leu	o	+	+	++	++++
Leu-val-leu					
leu-val	+	++	+++	++++	
val-leu	o	o	+	++	+++

(x) schwer löslich

Abbau mit Serum (Fortsetzung von S.9)

Peptid	5 Min.	15Min.	60Min.	5 Std.	20Std.
Ser-leu-leu	+	+	++	+++	++++
ß-Ala-leu↓-leu	o	o	o	o	+
ß-Ala-leu-leu↓-leu	o	o	o	+	++
α-Glu-gly	o	+	++	+++	++++
α-Glu-leu-leu	+	+	++	+++	++++
α-Glu-leu-leu-leu	o	+	++	+++	++++
γ-Glu-gly	o	o	o	o	o
γ-Glu-leu	o	o	o	o	o
γ-Glu-leu↓-leu	o	o	o	o	+
γ-Glu-leu↓-leu↓-leu	o	o	o	+	++
Gly-his	o	o	+	++	+++
His-gly	o	+	++	+++	++++
Leu-his	o	+	+++	++++	
His-leu	o	o	+	++	+++
His-leu-leu	o	+	++	+++	++++
Leu-leu-his					
leu-leu	++	+++	++++		
leu-his	o	+	++	+++	++++
Leu-his-leu					
leu-his	+	+	++	+++	++++
his-leu	o	o	+	++	+++
Leu-gly-his					
leu-gly	+	++	+++	++++	
gly-his	o	o	+	++	+++
Leu-his-gly					
leu-his	+	++	+++	++++	
his-gly	o	+	++	+++	++++
Gly-leu-his	+	+	++	+++	++++
Gly-his-leu	o	o	+	++	+++
His-gly-leu	o	+	++	+++	++++
His-leu-gly	o	+	++	++++	

Abbau mit Serum (Fortsetzung von S.10)

Peptid	5 Min.	15Min.	60Min.	5 Std.	20Std.
His-his-leu					
his-his	+	++	+++	++++	
his-leu	o	o	+	++	+++
His-leu-his	+	+	++	+++	++++
Gly↓-gly-gly-his-NH_2	o	o	o	+	++
D-leu-gly	o	o	o	o	o
Gly-D-leu	o	o	o	o	o
D-leu-gly-gly	o	o	o	o	o
D-leu-leu↓-leu	o	o	o	+	++
Leu-leu-D-leu					
leu-leu	o	+	++	+++	++++
leu-D-leu	o	o	o	o	o
Cbo-leu-gly	o	o	o	o	o
Cbo-gly-leu	o	o	o	o	o
Cbo-leu-leu	o	o	o	o	o
Cbo-leu-gly-gly	o	o	o	o	o
Cbo-gly-leu↓-leu	o	o	o	+	++
Benzoyl-leu-leu↓-gly	o	o	o	o	+

2. Abbau mit Leucinaminopeptidase

Peptid	5 Min.	15Min.	60Min.	5 Std.	20Std.
Leu-gly	++	+++	++++		
Gly-leu	o	o	+	++	+++
Leu-leu	+++	++++			
Leu-gly-gly					
leu-gly	++	+++	++++		
gly-gly	o	o	o	+	+
Gly-gly-leu	o	o	+	+	++
Gly-gly-phe	o	o	o	+	++
Gly-gly-val	o	o	o	+	++
Gly-leu-gly	o	+	++	+++	++++
Leu-leu-gly	+	++	+++	++++	
Gly-leu-leu	o	+	++	+++	++++
Leu-gly-leu					
leu-gly	+++	++++			
gly-leu	o	o	+	++	+++
Leu-leu-leu	++	+++	++++		
Gly-gly-leu-leu	o	o	o	+	++
Gly-leu-leu-leu	o	o	+	++	+++
Leu-leu-val					
leu-leu	+++	++++			
leu-val	++	+++	++++		
Val-leu-leu	o	+	++	+++	++++
Leu-val-leu					
leu-val	++	+++	++++		
val-leu	+	++	+++	++++	
Ser-leu-leu	+	+	++	+++	++++
ß-Ala-leu-leu	o	o	o	o	o
ß-Ala-leu-leu-leu	o	o	o	o	o
α-Glu-gly	o	+	++	+++	++++
α-Glu-leu-leu	+	++	+++	++++	
α-Glu-leu-leu-leu	+	++	+++	++++	
γ-Glu-leu	o	o	o	o	o

Abbau mit Leucinaminopeptidase (Fortsetzung v. S.12)

Peptid	5 Min.	15Min.	60Min.	5 Std.	20Std.
γ-Glu-leu-leu-leu	o	o	o	o	o
His-leu	o	+	++	+++	++++
Leu-his	+	++	+++	++++	
His-leu-leu	o	+	++	+++	++++
Leu-leu-his					
leu-leu	+	++	+++	++++	
leu-his	o	o	++	+++	++++
Leu-his-leu	+	+	+++	+++	++++
Leu-gly-his					
leu-gly	++	+++	++++		
gly-his	o	o	o	o	+
Leu-his-gly	o	+	++	+++	++++
Gly-leu-his	o	+	++	+++	++++
Gly-his-leu	o	+	+	++	+++
His-gly-leu					
his-gly	o	+	++	+++	++++
gly-leu	o	o	+	++	+++
His-leu-gly	+	+	++	+++	++++
His-leu-his	+	+	++	+++	++++
His-his-leu	o	+	+	++	+++
D-leu-gly	o	o	o	o	o
Gly-D-leu	o	o	o	o	o
D-leu-gly-gly	o	o	o	o	o
D-leu-leu-leu	o	o	o	o	o
Leu-leu-D-leu	+	+	++	++	+++
Cbo-leu-gly	o	o	o	o	o
Cbo-gly-leu	o	o	o	o	o
Cbo-leu-leu	o	o	o	o	o
Cbo-leu-gly-gly	o	o	o	o	o
Cbo-gly-leu-leu	o	o	o	o	o
Benzoyl-leu-leu-gly	o	o	o	o	o

3. Abbau mit Papain

Peptid	5 Min.	15Min.	60Min.	5 Std.	20Std.
Leu-gly	o	o	o	o	o
Gly-leu	o	o	o	o	o
Leu-leu	o	o	o	+	++
Leu↓-gly-gly	o	+	+	++	+++
Gly-gly-leu	o	o	o	o	o
Gly-gly-phe	o	o	o	o	o
Gly-gly-val	o	o	o	o	o
Gly-leu-gly	o	o	o	o	o
Leu↓-leu-gly	+	+	++	++	+++
Gly-leu↓-leu	o	o	o	+	+
Leu-gly↓-leu	++	+++	++++		
Leu-leu-leu	o	o	+	+	++
Leu-leu-leu-leu	o	o	+	+	++
Gly-gly↓-leu↓-leu	o	+	++	+++	++++
Gly-leu↓-leu↓-leu	o	+	+	++	++
Leu-leu↓-val	o	o	o	+	+
Val-leu↓-leu	o	+	+	++	+++
Leu-val-leu	o	o	o	o	o
Ser↓-leu↓-leu	o	+	+	++	++
ß-Ala-leu↓-leu	o	o	o	+	+
ß-Ala-leu-leu↓-leu	+	++	+++	++++	
α-Glu-gly	o	+	+	++	+++
α-Glu-leu-leu	+	+	++	+++	++++
α-Glu-leu-leu-leu	++	++	+++	+++	++++
γ-Glu-leu	o	o	o	o	o
γ-Glu-leu-leu	o	o	o	o	o
γ-Glu-leu-leu↓-leu	+	++	+++	++++	
Leu-his	o	o	o	o	o
His-leu	o	o	o	o	o
Leu↓-leu-his	+	++	+++	++++	

Abbau mit Papain (Fortsetzung von S.14)

Peptid	5 Min.	15Min.	60Min.	5 Std.	20Std.
His↓-leu-leu	o	+	+	++	+++
Leu↓-his-leu	o	o	+	+	++
Leu-gly↓-his	o	+	+	++	+++
Leu↓-his-gly	o	+	+	++	++
Gly-leu-his	o	o	o	o	o
Gly-his-leu	o	o	o	o	o
His-gly↓-leu	o	+	++	+++	++++
His↓-leu-gly	o	o	o	+	+
His-leu-his	o	o	o	o	o
His-his↓-leu	o	o	o	o	+
D-leu-gly	o	o	o	o	o
Gly-D-leu	o	o	o	o	o
D-leu-gly-gly	o	o	o	o	o
D-leu-leu-leu	o	o	o	o	o
Leu-leu-D-leu	o	o	o	o	o

4. Abbau mit Ficin

Peptid	5 Min.	15Min.	60Min.	5 Std.	20Std.
Leu-gly	o	o	o	o	o
Gly-leu	o	o	o	o	o
Leu-leu	o	+	++	+++	+++
Leu-gly-gly	o	o	+	++	+++
Gly-gly-leu	o	o	o	o	o
Gly-gly-phe	o	o	o	o	o
Gly-gly-val	o	o	o	o	o
Gly-leu-gly	o	o	o	o	o
Leu↓leu-gly	+	++	+++	++++	
Gly-leu↓leu	o	o	+	+	++
Leu-gly↓leu	++	+++	++++		
Leu-leu-leu	o	o	+	+	++
Leu-leu-leu-leu	o	+	+	++	+++
Gly-gly↓leu↓leu	+	+	++	+++	++++
Gly-leu↓leu-leu	+	+	++	+++	+++
Leu-leu-val					
leu-leu	+	+	++	+++	++++
leu-val	o	+	+	++	++
Val-leu↓leu	o	+	+	++	+++
Leu-val-leu	o	o	o	+	+
Ser-leu-leu	+	+	++	++	+++
ß-Ala-leu-leu	o	o	o	o	o
ß-Ala-leu-leu↓leu	++	+++	++++		
α-Glu-gly	o	o	o	o	o
α-Glu-leu-leu	+	++	+++	++++	
α-Glu-leu-leu-leu	+	++	+++	++++	
γ-Glu-leu	o	o	o	o	o
γ-Glu-leu-leu	o	o	o	o	o
γ-Glu-leu-leu↓leu	+	++	+++	++++	

Abbau mit Ficin (Fortsetzung von S.16)

Peptid	5 Min.	15Min.	60Min.	5 Std.	20Std.
Leu-his	o	o	o	+	+
His-leu	o	o	o	o	+
Leu-leu-his	+	++	++	+++	+++
His-leu-leu	+	+	++	++	+++
Leu↓-his-leu	+	++	+++	++++	
Leu-gly↓-his	o	+	+	++	+++
Leu↓-his-gly	o	+	+	++	+++
Gly-leu-his	o	o	o	o	o
Gly-his-leu	o	o	o	o	o
His-gly↓-leu	+	++	+++	++++	
His↓-leu-gly	o	o	o	+	+
His-his↓-leu	o	o	+	++	+++
His↓-leu-his	o	o	o	o	+
D-leu-gly	o	o	o	o	o
Gly-D-leu	o	o	o	o	o
D-leu-gly-gly	o	o	o	o	o
D-leu-leu-leu	o	o	o	o	o
Leu-leu-D-leu	o	o	o	o	o

5. Abbau mit Pronase

Peptid	5 Min.	15Min.	60Min.	5 Std.	20Std.
Leu-gly	+	++	++++		
Gly-leu	o	o	o	+	+
Leu-leu	+++	++++			
Leu↓-gly-gly	++++				
Gly-gly↓-leu	o	+	+	+	++
Gly-gly↓-phe	o	o	o	o	+
Gly-gly-val	o	o	o	o	+
Gly-leu-gly	o	o	o	+	++
Leu-leu-gly					
leu-leu	++++				
leu-gly	++	+++	++++		
Gly-leu-leu					
leu-leu	+	++	+++	++++	
gly-leu	o	o	o	+	+
Leu-gly-leu					
leu-gly	+++	++++			
gly-leu	o	o	o	+	+
Leu-leu-leu	+++	++++			
Leu-leu-leu-leu	+	++	+++	+++	++++
Gly-gly↓-leu↓-leu	+++	++++			
Gly-leu↓-leu↓-leu					
leu-leu	+++	++++			
gly-leu	o	o	o	+	+
Leu↓-leu↓-val	+++	++++			
Val↓-leu↓-leu	++	+++	++++		
Leu-val-leu					
leu-val	+++	++++			
val-leu	+	++	++++		
Ser-leu-leu					
leu-leu	+	++	++++		
ser-leu	o	+	+	++	+++

Abbau mit Pronase (Fortsetzung von S.18)

Peptid	5 Min.	15Min.	60Min.	5 Std.	20Std.
ß-Ala-leu-leu					
leu-leu	++	+++	++++		
ß-ala-leu	o	o	o	o	o
ß-Ala-leu↓-leu↓-leu	+++	++++			
α-Glu-gly	o	o	o	o	+
α-Glu-leu-leu	+	++	+++	++++	
α-Glu-leu-leu-leu	++	+++	++++		
γ-Glu-leu	o	o	o	o	o
γ-Glu-leu↓-leu	+	++	+++	++++	
γ-Glu-leu↓-leu↓-leu	++	+++	++++		
Leu-his	++	+++	++++		
His-leu	o	o	o	+	+
Leu-leu-his					
leu-leu	+++	++++			
leu-his	++	+++	++++		
His-leu-leu					
leu-leu	++	+++	++++		
his-leu	o	o	+	++	+++
Leu-his-leu					
leu-his	++	+++	++++		
his-leu	o	+	+	++	++
Leu-gly-his					
leu-gly	++	+++	++++		
gly-his	o	o	o	o	o
Leu-his-gly					
leu-his	++	+++	++++		
his-gly	o	o	o	o	o
Gly-leu-his					
gly-leu	o	o	o	o	+
leu-his	o	o	+	++	+++

Abbau mit Pronase (Fortsetzung von S.19)

Peptid	5 Min.	15Min.	60Min.	5 Std.	20Std.
Gly-his↓-leu	o	o	+	+	++
His-leu-gly					
his-leu	o	o	+	++	+++
leu-gly	o	+	++	+++	++++
His-gly-leu					
his-gly	o	o	o	o	o
gly-leu	o	+	++	+++	++++
His-his↓-leu	o	+	+	++	+++
His↓-leu↓-his	o	o	+	++	++
D-leu-gly	o	o	o	o	o
Gly-D-leu	o	o	o	o	o
D-leu-gly-gly	o	o	o	o	o
D-leu-leu-leu					
D-leu-leu	o	o	o	o	o
leu-leu	+	++	+++	++++	
Leu-leu-D-leu					
leu-leu	+	++	+++	++++	
leu-D-leu	o	o	o	o	o

IV Diskussion der Abbauversuche

1. Serum

Aus den vorstehenden Tabellen geht hervor, daß sämtliche geprüften Peptide durch Serum in ähnlicher Weise abgebaut werden wie durch Leucinaminopeptidase, jedoch durch Serum zum Teil bedeutend schneller. Man muß dies auf ein Zusammenwirken mehrerer Aminopeptidasen im Serum zurückführen. So werden z. B. Leu-gly, Leu-leu oder Leu-leu-leu durch Serum und Leucinaminopeptidase mit ähnlicher Geschwindigkeit gespalten. Gly-leu, Gly-gly-leu, Gly-gly-phe und Gly-gly-val werden jedoch durch das Zusammenwirken von Gly-gly-Dipeptidase, Gly-leu-Dipeptidase und Leucinaminopeptidase im Serum wesentlich rascher gespalten als durch Leucinaminopeptidase allein.

Sämtliche Peptide, die aminoendständig eine atypische Bindung oder eine atypische Aminosäure enthalten, z. B. ß-Ala-leu-leu-leu, γ-Glu-leu-leu-leu oder D-leu-leu-leu und alle Peptide mit blockierter Aminogruppe z. B. Cbo-leu-leu werden durch Leucinaminopeptidase überhaupt nicht und von Serum nur sehr wenig angegriffen. Daraus, sowie aus einem Vergleich des Serumabbaus mit dem von Leucinaminopeptidase ist ersichtlich, daß die peptidspaltende Wirkung des Serums praktisch ausschließlich auf Aminopeptidasen zurückgeführt werden kann. Ein wirksamer Schutz gegen die Aminopeptidasen des Serums könnte nur durch eine Blockierung der freien Aminogruppe oder durch eine aminoendständige atypische Aminosäure erreicht werden. Ein Schutz durch bestimmte natürliche aminoendständige Aminosäurekombinationen wie bei Leucinaminopeptidase ist beim Serum nicht möglich, weil durch das Zusammenwirken mehrerer Peptidasen im Serum praktisch jede

natürliche Aminosäurekombination mehr oder weniger rasch gespalten wird.

Eine Carboxypeptidase im Serum war bisher nicht bekannt. Die Tatsache jedoch, daß Peptide mit blockierter Aminogruppe wie Cbo-gly-leu-leu und Peptide mit einer aminoendständigen atypischen Aminosäure sehr langsam vom Carboxylende her (ß-Ala-leu-leu-leu in ß-Ala-leu-leu und Leucin, γ-Glu-leu-leu-leu in γ-Glu-leu-leu und Leucin; niemals tritt freies ß-Alanin oder freie Glutaminsäure auf) gespalten werden, läßt sich nur deuten, wenn man eine Carboxypeptidaseaktivität im Serum annimmt. Sie ist jedoch im Vergleich zur Aminopeptidaseaktivität sehr gering.

Wahrscheinlich handelt es sich dabei um Carboxypeptidase A, denn die Serumcarboxypeptidase greift wie Carboxypeptidase A bevorzugt an Aminosäuren mit grosser Seitenkette wie z. B. am Leucin an, während Glycin nur schwer freigesetzt wird. So wird Cbo-gly-leu-leu am stärksten angegriffen (zu ungefähr 10% nach 20 Stdn. in Cbo-gly-leu und Leucin), Benzoyl-leu-leu-gly wesentlich weniger und Cbo-leu-gly-gly überhaupt nicht.

2. Leucinaminopeptidase

Leucinaminopeptidase ist eine typische Exopeptidase, denn sie spaltet nur Substrate mit freier Aminogruppe, und schon Acetylierung macht ein Peptid unangreifbar.

Die relative Spaltungsgeschwindigkeit verschiedener Substrate zeigt (30-33), daß der Angriff durch Leucinaminopeptidase eng verknüpft ist mit der Art der Seitenkette der aminoendständigen Aminosäure. Je hydrophober sie ist, um so besser greift Leucinaminopeptidase an. Das deutet darauf hin, daß im Enzym be-

stimmte Haftstellen für hydrophobe Reste existieren. Daß eine solche Anlagerung der Spaltung einer Peptidbildung vorangeht, folgt schon daraus, daß das Enzym durch Verbindungen mit hydrophober Seitenkette, z. B. höhere Alkohole (n-Hexanol (34)) und besonders durch Leucin selbst kompetitiv gehemmt wird (34). Das erklärt auch die Tatsache, daß Leu-gly allein rascher gespalten wird als etwa Leu-gly, das aus Leu-leu-gly durch Abbau entstanden ist und noch freies Leucin enthält.

Die Abspaltungsgeschwindigkeit aminoendständiger Aminosäuren nimmt ab in der Reihenfolge: Leucin = Norleucin, Norvalin, Isoleucin, Valin, Glutaminsäure (α-Bindung), Histidin, Alanin, Glycin. Daneben existieren noch einige Aminosäurekombinationen, die durch Leucinaminopeptidase besonders schlecht angegriffen werden, z. B. Gly-gly, Gly-pro oder Gly-his. Man kann also ein größeres Peptid durch aminoendständiges Gly-gly, Gly-pro oder Gly-his vor einem Angriff durch Leucinaminopeptidase schützen.

Aminoendständige atypische Aminosäuren oder Aminosäuren in atypischer Bindung verhindern einen Angriff durch Leucinaminopeptidase vollständig. ß-Ala-leu-leu wird nicht abgebaut, ebensowenig γ-Glu-leu-leu oder D-leu-leu-leu. Steht die atypische Aminosäure an zweiter Stelle vom Aminoende aus gerechnet, so wird die Spaltung nicht wesentlich beeinflußt. Leu-ß-ala wird ebenso rasch gespalten wie Leu-gly. Steht jedoch eine D-Aminosäure an zweiter Stelle vom Aminoende aus gerechnet, dann ist die Spaltung stark verzögert und auch noch an dritter Stelle vom Aminoende aus gerechnet beeinflußt eine D-Aminosäure die Spaltung. Leu-D-leu wird praktisch nicht gespalten, Leu-leu-D-leu wird wesentlich langsamer in Leucin und Leu-D-leu gespalten als Leu-leu-leu.

3. Papain

Papain baut Proteine wesentlich weiter ab als Pepsin und Trypsin. Mit Papain verdautes Protein wird von Pepsin und Trypsin nicht weiter angegriffen, während mit Pepsin bzw. Trypsin verdautes Protein durch Papain weiter abgebaut wird (35). Über seine genaue Spezifität ist jedoch noch wenig bekannt (36-41) und auch aus den vorliegenden Untersuchungen war darüber recht wenig zu entnehmen.

Dipeptide werden, wenn überhaupt, nur sehr langsam abgebaut (Leu-leu).

Tripeptide werden ebenfalls zu einem großen Teil überhaupt nicht oder nur sehr wenig gespalten. Ein kleiner Teil wird, allerdings ohne daß eine allgemeine Spezifität zu erkennen wäre, ziemlich rasch abgebaut.

Gly-gly-leu und Gly-leu-gly werden praktisch nicht angegriffen, Leu-gly-gly dagegen wird langsam in Leucin und Gly-gly gespalten. Daneben tritt noch schwach Leu-leu auf. Leu-leu-gly wird langsam in Leucin und Glycin gespalten. Als Zwischenprodukt tritt Leu-leu auf. Gly-leu-leu wird sehr langsam in Glycin, Leucin, Gly-leu und Leu-leu gespalten. Daneben treten noch einige nicht sicher identifizierbare Nebenprodukte auf. Leu-gly-leu dagegen wird rasch und eindeutig innerhalb von 30 Min. in Leucin und Leu-gly gespalten. α-Glu-leu-leu wird innerhalb von 20 Stdn. vollständig gespalten. His-leu-leu wird in 20 Stdn. teilweise abgebaut zu Leu-his, Leu-leu, Leucin und wenig Histidin und His-leu. Diese Spaltung ist nur zu verstehen, wenn man annimmt, daß Synthese neuer im Ausgangspeptid nicht vorgezeichneter Peptide eventuell durch Transpeptidisierung stattgefunden hat. Aus dem Chromatogramm ist zu entnehmen, daß primär Spaltung in Histidin und Leu-leu eintritt. Leu-leu würde nun in Abwesenheit von Histidin langsam zu

Leucin abgebaut. In Anwesenheit von Histidin findet jedoch eine Transpeptidisierungsreaktion statt derart, daß bei Spaltung einer Leu-leu-Bindung gleichzeitig eine Leu-his-Bindung geknüpft wird.

Leu-leu + His ⟶ Leu-his + Leu

Das erklärt erstens das starke Auftreten von Leu-his und zweitens die von 15 Min. bis 20 Stdn. gleichbleibende Menge an freiem Histidin. Nicht erklärt werden kann jedoch, warum die Bildung von Leu-his gegenüber His-leu stark bevorzugt ist.

Ähnliche Effekte, die sich durch eine Transpeptidisierung erklären ließen, treten bei anderen Peptiden auch auf, nur wären die entstehenden Bruchstücke meist auch zu erklären durch einen gleichzeitigen Angriff des Enzyms vom Aminoende und Carboxylende her.

In der Literatur sind ebenfalls mehrfach Transpeptidisierungsreaktionen mit Papain beschrieben (42-45).

Der Abbau von Tetrapeptiden ist durch die Möglichkeit von Transpeptidisierungsreaktionen ebenfalls unübersichtlich. Über den genauen Ort der Spaltung läßt sich nur in einigen Sonderfällen etwas aussagen. Meist ist aus dem Chromatogramm nicht zu entnehmen, ob ein Bruchstück durch primären Angriff von Papain entstanden ist, oder ob das Bruchstück erst sekundär durch Transpeptidisierung gebildet wurde. Lediglich beim Abbau von ß-Ala-leu-leu-leu, α-Glu-leu-leu-leu und γ-Glu-leu-leu-leu sind eindeutige Aussagen möglich. ß-Ala-leu-leu-leu wird gespalten in ß-Ala-leu-leu und Leucin, γ-Glu-leu-leu-leu in Leucin und γ-Glu-leu-leu, während α-Glu-leu-leu-leu vollständig abgebaut wird.

Papain ist eine typische Endopeptidase im Sinne von P. Desnuelle (46), ihre Spezifität ist gekoppelt mit einer bestimmten spezifischen Umgebung der zu spaltenden Bindung. Mit kleineren Peptiden als Substraten ist diese Spezifität nicht zu ergründen.

4. Ficin

Ficin ähnelt in seiner Spezifität sowie in seinen übrigen Eigenschaften stark dem Papain (47,48). Auch bei Ficin treten in noch stärkerem Maße als bei Papain neben der primären Spaltung einer Peptidbindung sekundäre Transpeptidisierungsreaktionen auf (49). Es ist deshalb oft schwierig oder unmöglich, aus dem Chromatogramm die Primärreaktion zu entnehmen. Über die Spezifität von Ficin läßt sich deshalb aus den vorliegenden Abbauversuchen auch nicht sehr viel aussagen.

Dipeptide werden wie bei Papain, wenn überhaupt, nur sehr langsam gespalten (Leu-leu).

Die Spaltung der Tri- und Tetrapeptide ist bis auf kleine Unterschiede in der Reaktionsgeschwindigkeit praktisch identisch mit der von Papain. Merkwürdig ist nur, daß wie übrigens auch bei Papain einige Peptide, z. B. Leu-gly-leu, α-Glu-leu-leu, α-Glu-leu-leu-leu, Leu-leu-val, His-gly-leu glatt ohne jede Nebenreaktion gespalten werden, während bei einer ganzen Zahl anderer Peptide in beträchtlichem Maße Transpeptidisierungsreaktionen eintreten. So tritt bei der Spaltung von Leu-gly-gly nach 20 Stdn. neben normalen Spaltprodukten deutlich Leu-leu auf. Bei Spaltung von Gly-leu-leu-leu tritt Leu-gly auf und bei His-leu-leu erscheint Leu-his sogar ziemlich stark. Bei Spaltung von Leu-his-leu erscheint Leu-leu und bei Spaltung von His-his-leu tritt Leu-his auf neben jeweils normalen Spaltprodukten.

Ficin ist wie Papain eine typische Endopeptidase und benötigt für optimale Wirksamkeit eine ganz bestimmte räumliche Umgebung der zu spaltenden Peptidbindung: Leu-leu-gly und Gly-leu-leu werden nur langsam gespalten. Dabei bilden sich viele Nebenprodukte. Leu-gly-leu dagegen wird sehr rasch gespalten ohne Bildung von Nebenprodukten. Aus der Spaltung von kleineren Peptiden läßt sich deshalb keine endgültige Spezifität ableiten.

5. Pronase

Pronase, ein Enzym pflanzlichen Ursprungs, wurde erst vor einigen Jahren aus Streptomyces griseus isoliert (50,51). Sie besitzt einige recht ungewöhnliche Eigenschaften wie man sie bei bis jetzt bekannten proteolytischen Enzymen nicht findet. Pepsin, Trypsin und Chymotrypsin ebenso wie Papain spalten längere Proteinketten in spezifischer Weise, Leucinaminopeptidase und Carboxypeptidase spalten sowohl von längeren Peptidketten als auch von kürzeren Peptiden die aminoendständige bzw. carboxylendständige Aminosäure ab, während Pronase die beiden Eigenschaften einer Endopeptidase und einer Exopeptidase in sich vereinigt und mit der bisherigen Nomenklatur nicht exakt charakterisiert werden kann. Man müßte sie als Endo-Exopeptidase bezeichnen, denn sie spaltet sowohl kleinere Peptide als auch längere Proteinmoleküle mit erstaunlicher Geschwindigkeit und geringer Spezifität sowohl vom Carboxyl- und Aminoende her als auch mitten in der Kette.

Die Verdauungsenzyme Pepsin, Trypsin, Chymotrypsin und Papain spalten in einem Protein nur ganz bestimmte Bindungen entsprechend ihrer Spezifität. Das Ausmaß der Hydrolyse ist von Protein zu Protein verschieden und schwankt zwischen 10 und 30%. Pronase dagegen spaltet zu 60 bis 90%. Schon daraus ist ihre geringe Spezifität ersichtlich.

Spezifitätsuntersuchungen an Oligopeptiden

1) Pronase spaltet glatt die meisten Dipeptide mit Ausnahme von Gly-gly, Gly-his, Gly-pro und Gly-leu.
2) Pronase spaltet besonders gut Leu-leu-Bindungen.
3) Pronase spaltet nicht Dipeptide, die atypische Aminosäuren oder Aminosäuren in atypischer Bindung z. B. ß-Alanin oder Glutaminsäure in γ-Bindung enthalten.

4) Pronase spaltet nicht Dipeptide, die D-Aminosäuren enthalten.
5) Pronase spaltet Tripeptide je nach Aminosäurezusammensetzung entweder vom Aminoende oder vom Carboxylende her. So wird Leu-leu-gly und Leu-gly-gly rasch vom Aminoende her, Gly-leu-leu und Gly-gly-leu vom Carboxylende her angegriffen. Pronase greift offensichtlich bevorzugt an aminoendständigem Leucin an. Übergang von Leucin zu Valin oder Phenylalanin setzt die Spaltungsgeschwindigkeit stark herab.
6) Enthält ein Tripeptid eine atypische Aminosäure oder eine Aminosäure in atypischer Bindung, so wird es zum Dipeptid abgebaut, das die atypische Aminosäure noch enthält, ß-Ala-leu-leu z. B. zu ß-Ala-leu und Leucin.
7) Enthält ein Tripeptid eine D-Aminosäure, so wird es wiederum zum Dipeptid abgebaut, das die D-Aminosäure noch enthält. Aus D-leu-leu-leu entsteht D-leu-leu und Leucin.
8) Tetrapeptide werden ähnlich abgebaut wie Tripeptide. Bei geeigneter Aminosäurezusammensetzung kann jedoch auch Spaltung in der Mitte eintreten. So muß man aus dem Abbau von Gly-gly-leu-leu schließen (Gly-gly-leu tritt nicht auf als Zwischenprodukt), daß Leu-leu abgespalten wird. Da Leu-leu schneller weitergespalten wird in Leucin als Leu-leu aus Gly-gly-leu-leu entsteht, tritt freies Leu-leu in nennenswertem Umfange nicht auf.

   Enthält ein Tetrapeptid eine atypische oder eine D-Aminosäure, so tritt Spaltung in Tripeptid bzw. Dipeptid ein, das die atypische Aminosäure noch enthält. ß-Ala-leu-leu-leu geht über in ß-Ala-leu und Leucin.

6. Pepsin

Nach Untersuchungen an synthetischen Peptiden sollte Pepsin an der Aminogruppe von aromatischen Aminosäuren angreifen (55-63). Acylierung der freien Aminogruppe beschleunigt die Spaltung. So wird Acetyl-phe-phe wesentlich schneller gespalten als Phe-phe.

Wie wenig jedoch durch Untersuchungen an synthetischen Substraten die Spezifität des Pepsins definiert ist, zeigt ein Vergleich mit natürlichen Substraten (Ribonuclease, Tabakmosaikvirus, Insulin usw.). Nur ein kleiner Teil der hydrolysierten Bindungen entspricht etwa denen, wie sie auch in synthetischen Substraten gespalten werden. Viel größer ist die Zahl der anomalen Bindungen, die angegriffen werden. Anscheinend hängt die Spezifität in noch unbekannter Weise von der Struktur des Gesamtmoleküls ab (64).

Das vorliegende Peptidmaterial enthielt nur ein Peptid mit einer aromatischen Aminosäure, nämlich Gly-gly-phe. Merkwürdigerweise wurde Gly-gly-phe überhaupt nicht gespalten. Es ist allerdings bekannt, daß Glycylpeptide von Pepsin nur schwer angegriffen werden (55). Sämtliche Histidinpeptide — der Imidazolring hat ja bekanntlich beträchtlichen aromatischen Charakter — wurden nicht angegriffen. Dagegen wurde aus folgenden Peptiden sehr langsam carboxylendständiges Leucin abgespalten (nach 20 Stdn. zu ungefähr 5%):

α-Glu-leu-leu-leu	Gly-gly-leu-leu
α-Glu-leu-leu	Gly-leu-leu-leu
ß-Ala-leu-leu-leu	Ser-leu-leu

Bei α-Glu-leu-leu und Ser-leu-leu trat nach 20 Stdn. sogar freie Glutaminsäure bzw. freies Serin in Spuren auf.

7. Chymotrypsin

Nach bisherigen Spezifitätsuntersuchungen (56, 66, 67) spaltet Chymotrypsin Peptidbindungen an der Carboxylgruppe von aromatischen Aminosäuren. Als aromatisch in diesem Sinne erwiesen sich Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan. Daneben soll Chymotrypsin auch in beträchtlichem Maße Leucyl- (68), Methionyl- (69), Asparaginyl- (68) und Glutamylbindungen (70) spalten.

Mit dem vorliegenden Peptidmaterial wurde nun geprüft, inwieweit Histidylpeptide von Chymotrypsin angegriffen werden — der Imidazolring hat ja beträchtlichen aromatischen Charakter — und ob tatsächlich auch Leucyl- und Glutamylbindungen gespalten werden. Es ergab sich, daß Chymotrypsin zwar an der Carboxylgruppe von Histidin und Leucin angreift, aber nur äußerst langsam. Bei einer relativ hohen Enzymkonzentration waren nach 20 Stdn. im günstigsten Falle einige Prozente gespalten.

Die Spaltung von Glutamylbindungen auch in Spuren konnte an den vorliegenden Peptiden nicht beobachtet werden. Es ist jedoch bekannt, daß Chymotrypsin mit zunehmender Kettenlänge eines Peptids immer mehr anomale Bindungen spaltet (64), was man auf einen Einfluß des Gesamtmoleküls zurückführen muß. So werden im Corticotropin, in der Ribonuclease und im Tabakmosaikvirus sechs Peptidbindungen durch Chymotrypsin gespalten, die auch im Insulin vorkommen, aber dort vollkommen stabil gegenüber Chymotrypsin sind (64).

8. Trypsin

Trypsin spaltet hochspezifisch nur Peptidbindungen an der Carboxylgruppe stark basischer Aminosäuren (11). Blockiert man in einem Protein die ε-Aminogruppe des Lysins durch Acetylierung, so spaltet Trypsin nur Arginylbindungen.

Erwartungsgemäß zeigte deshalb Trypsin an den vorliegenden Peptiden nicht die geringste peptidspaltende Wirkung. Histidin ist zwar auch etwas basisch, anscheinend für Trypsin jedoch nicht basisch genug.

V Hydrolyse mit 10n HCl bei 38°C

Peptid	15Min.	60Min.	5 Std.	20Std.	40Std.
Leu-gly	o	o	+	+	++
Gly-leu	o	+	+	+	++
Leu-leu	o	o	o	+	+
Leu-gly-gly					
leu-gly	o	o	+	+	++
gly-gly	o	+	+	++	+++
Gly-gly-leu					
gly-gly	o	+	+	++	+++
gly-leu	o	+	+	+	++
Gly-gly-phe					
gly-gly	o	+	+	++	+++
gly-phe	o	+	++	++	+++
Gly-gly-val					
gly-gly	o	+	+	++	+++
gly-val	o	o	+	+	++
Gly-leu-gly					
gly-leu	o	+	+	+	++
leu-gly	o	o	+	+	++
Leu-leu-gly					
leu-leu	o	o	o	+	+
leu-gly	o	o	+	+	++
Gly-leu-leu					
gly-leu	o	+	+	+	++
leu-leu	o	o	+	+	+
Leu-gly-leu					
leu-gly	o	o	+	+	++
gly-leu	o	+	+	++	++
Leu-leu-leu	o	o	o	+	+
Leu-leu-leu-leu	o	o	o	+	+

Hydrolyse mit 10n HCl (Fortsetzung von S.32)

Peptid	15Min.	60Min.	5 Std.	20Std.	40Std.
Gly-gly-leu-leu					
gly-gly	o	+	+	++	+++
gly-leu	o	+	++	++	+++
leu-leu	o	o	+	+	+
Gly-leu-leu-leu					
gly-leu	o	+	+	+	++
leu-leu	o	o	+	+	+
Leu-leu-val					
leu-leu	o	o	o	o	+
leu-val	o	o	+	+	+
Val-leu-leu					
val-leu	o	o	o	o	+
leu-leu	o	o	o	+	+
Leu-val-leu	o	o	o	+	+
Ser-leu-leu					
ser-leu	o	+	+	++	++
leu-leu	o	o	+	+	+
ß-Ala-leu-leu					
ß-ala-leu	o	+	+	++	+++
leu-leu	o	o	+	+	+
ß-Ala-leu-leu-leu					
ß-ala-leu	o	+	++	++	+++
leu-leu	o	o	+	+	+
α-Glu-gly	o	+	++	+++	++++
α-Glu-leu-leu	o	o	+	+	++
α-Glu-leu-leu-leu	o	o	+	+	++
γ-Glu-gly	+	++	+++	++++	
γ-Glu-leu	o	o	+	+	++
γ-Glu-leu-leu	o	o	+	+	++
γ-Glu-leu-leu-leu	o	o	+	+	++

Hydrolyse mit 10n HCl (Fortsetzung von S.33)

Peptid	15Min.	60Min.	5 Std.	20Std.	40Std.
Leu-his	o	o	+	+	++
His-leu	o	o	o	+	++
Leu-leu-his	o	o	+	++	+++
His-leu-leu	o	o	o	+	++
Leu-his-leu	o	o	+	++	++
Leu-gly-his	o	+	+	++	+++
Gly-leu-his	o	+	+	++	+++
Leu-his-gly	o	o	+	+	++
Gly-his-leu	o	o	+	++	++
His-gly-leu	o	o	+	++	+++
His-leu-gly	o	o	o	+	++
His-his-leu	o	o	o	+	+
His-leu-his	o	o	o	o	+
D-leu-gly	o	o	+	+	++
Gly-D-leu	o	+	+	+	++
D-leu-gly-gly	o	+	+	++	+++

VI Diskussion des HCl-Abbaus

Beim Abbau von Proteinen mit conc. HCl bei 100° tritt gewöhnlich Spaltung in einzelne Aminosäuren ein. Führt man den Abbau jedoch unter etwas milderen Bedingungen durch, z. B. mit 10n HCl bei 38°, so treten neben freien Aminosäuren auch größere Bruchstücke, etwa Di-, Tri- und Tetrapeptide auf. Offensichtlich werden also bestimmte Peptidbindungen bevorzugt gespalten, andere wiederum sind gegenüber saurer Hydrolyse relativ stabil. Es wurde nun versucht, durch Abbau einer größeren Zahl von Oligopeptiden mit 10n HCl bei 38° Aufschluß zu gewinnen über den Zusammenhang zwischen der Struktur von Aminosäuren und der Stabilität der von ihnen gebildeten Peptidbindungen.

Es ergab sich zunächst, daß sämtliche geprüften Peptide durch 10n HCl bei 38° ziemlich langsam gespalten werden, Dipeptide schwerer als vergleichbare Tripeptide und diese wiederum schwerer als vergleichbare Tetrapeptide. Einige Peptide sind sogar so stabil, daß sie ohne nennenswerte Hydrolyse längere Zeit mit conc. HCl auf 100° erhitzt werden können (Leu-leu, Val-val, Leu-leu-leu, Leu-leu-leu-leu). Die Spaltung erfolgt bei Tripeptiden bevorzugt am Carboxylende, bei Tetrapeptiden am Carboxylende oder in der Mitte. In jedem Falle ist die der freien Aminogruppe benachbarte Peptidbindung relativ stabil.

Für Dipeptide ergab sich folgende Reihenfolge (steigende Stabilität): γ-Glu-gly, Gly-gly, α-Glu-gly, γ-Glu-leu, ß-Ala-leu, α-Glu-leu, Ser-leu, Gly-phe, Gly-leu, Gly-val, Leu-gly, Leu-his, His-leu, Leu-leu, Leu-val, Val-leu, Val-val (vergleiche 71-77).

Tripeptide zeigten eine ähnliche Stabilitätsabstufung: Gly-leu-gly ist wesentlich stabiler als Gly-gly-

leu und Leu-gly-gly, während zwischen den beiden letzteren merkwürdigerweise kaum ein Unterschied besteht. Leu-leu-gly ist stabiler als Gly-leu-leu und Leu-gly-leu, besonders stabil ist Leu-leu-leu.

Enthält ein Peptid noch Histidin, so nimmt erstens die absolute Spaltungsgeschwindigkeit ab — es ist schon lange bekannt, daß basische Peptide gegenüber saurer Hydrolyse sehr stabil sind — und zweitens hängt die Stabilität noch von der Stellung des Histidins ab. Peptide mit carboxylendständigem Histidin werden besser gespalten als Peptide mit aminoendständigem Histidin.

Tetrapeptide werden, mit Ausnahme von Leu-leu-leu-leu, wesentlich besser gespalten und zwar je nach Struktur bevorzugt am Carboxylende (Gly-leu-leu-leu) oder in der Mitte (Gly-gly-leu-leu).

Beim Abbau von Gly-gly-phe wurden neben dem normalen Spaltprodukt Gly-phe auch beträchtliche Mengen Phe-gly gefunden (80).

Zum Verständnis dieser Ergebnisse muß man sich mit dem Reaktionsmechanismus der sauren Hydrolyse einer Peptidbindung befassen. Nach BENDER, GINGER und KEMP (78,79) ist die Primärreaktion und zugleich der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Angriff eines Protons am Carbonylsauerstoff. Die Spaltung wäre demnach abhängig von der Elektronendichte am Sauerstoff, die wiederum von der Struktur der benachbarten Reste abhängt. Alle Effekte, die die Elektronendichte erniedrigten, verlangsamten die Spaltung und umgekehrt. Die Autoren halten jedoch auch einen von HIROHATA (81) angenommenen ziemlich andersartigen Mechanismus für möglich, nämlich einen Angriff am Stickstoff. Die Primärreaktion und zugleich der geschwindigkeitsbestimmende Schritt wäre dann nach HIROHATA die Bildung eines aktivierten Komplexes der Peptidbindung mit hydratisierter Salzsäure. Die experimentellen Daten

lassen sich jedoch wesentlich plausibler mit einem Angriff am Sauerstoff deuten.

Bei beiden Mechanismen erfolgt der Angriff durch ein Proton. Das erklärt erstens die Zunahme der Stabilität vom Tetra- über Tri- zum Dipeptid und zweitens die bevorzugte Spaltung am Carboxylende. Die freie Aminogruppe eines Peptids liegt ja in stark saurer Lösung in protonisierter Form vor und trägt dadurch eine positive Ladung. Die Anlagerung eines ebenfalls positiv geladenen Protons wird deshalb umso leichter erfolgen, je weiter der Angriffspunkt von eben dieser protonisierten Aminogruppe entfernt ist.

Die Stabilitätsabstufung der Dipeptide läßt sich zwanglos erklären einerseits durch Zunahme des Abstandes der protonisierten Aminogruppe vom Angriffspukt des Protons (γ-Glu-gly, γ-Glu-leu, ß-Ala-leu), andererseits durch sterische Effekte. Lediglich bei serin- und phenylalaninhaltigen Peptiden dürfte der -I-Effekt der OH- bzw. Benzylgruppe einen gewissen Einfluß ausüben.

Der Stabilitätsunterschied zwischen Leu-gly und Gly-leu läßt sich nur erklären, wenn man einen Angriff am Sauerstoff annimmt. Dann müßten sich nämlich beim Leu-gly sterische Einflüsse der Seitengruppe stärker bemerkbar machen als bei Gly-leu, dessen Carbonylgruppe vom Isobutylseitenrest noch durch ein N-Atom getrennt ist. In der Tat ist Leu-gly bei der sauren Hydrolyse wesentlich stabiler als Gly-leu.

Ebenso kann die bessere Spaltbarkeit von Gly-phe gegenüber Gly-leu nur auf den -I-Effekt des Benzylrestes und damit auf einen Angriff am Sauerstoff zurückgeführt werden, denn die Raumerfüllung und damit die sterische Hinderung des Benzylrestes und der Isobutylseitenkette ist erfahrungsgemäß gleich. Ähnliches gilt für die geringere Stabilität von Ser-leu gegenüber Gly-leu, obwohl die sterischen Verhältnisse gerade das Gegenteil erwarten ließen. Die Zunahme des

Seitenrestes beim Serin und die damit verbundene Vergrößerung des sterischen Effektes wird weit überkompensiert durch die elektronenanziehende Wirkung der OH-Gruppe.

Die hohe Stabilität von Leu-his, His-leu und ganz allgemein von Histidinpeptiden ist auf die zusätzliche positive Ladung des Imidazolringes zurückzuführen. Die größere Stabilität von His-leu gegenüber Leu-his ist wohl in der Anhäufung zweier positiver Ladungen in nächster Nähe der Carbonylgruppe zu suchen und spricht wieder für einen Angriff am Sauerstoff.

Die hohe Säurestabilität von Leu-leu, Leu-leu-leu, Leu-leu-leu-leu, Leu-val, Val-leu und Val-val kann ausschließlich durch sterische Effekte der Isobutyl- bzw. Isopropylseitenkette erklärt werden (82,83).

Das merkwürdige Auftreten von Phe-gly bei der Spaltung von Gly-gly-phe wird von LONG und TRUSCOTT (80) darauf zurückgeführt, daß aus Gly-phe teilweise das entsprechende Diketopiperazin gebildet wird. Dieses Diketopiperazin wird nun durch den sterischen Einfluß der Benzylseitenkette bevorzugt in Phe-gly gespalten. Daß bei der Spaltung der übrigen Peptide ein ähnlicher Effekt nich beobachtet wurde, rührt wohl daher, daß nur bei Gly-phe infolge des -I-Effektes des Benzylrestes eine merkliche Diketopiperazinbildung eintritt.

VII Experimenteller Teil

1. Allgemeine Synthesen

Peptidsynthesen mit Cbo-histidinhydrazid

10 mMol Cbo-histidinhydrazid werden in 15 ccm 2n HCl gelöst und durch Zugabe von 0,7g Natriumnitrit bei 0° in das Azid überführt. Nach 2 Min. werden 50 ccm vorgekühltes Chloroform zugesetzt, die 2,8 ccm Triäthylamin enthalten. Die Lösung des Azids in Chloroform wird nun abgetrennt, über Natriumsulfat getrocknet und zu einer vorgekühlten Lösung von 1,4 ccm Triäthylamin und 10 mMol Aminosäure- oder Peptidester HCl in Chloroform filtriert. Die Lösung wird mehrere Stdn. bei 0° und über Nacht bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Dann wird mit Wasser, Bikarbonat und wieder Wasser gewaschen, getrocknet und das Chloroform i. Vak. abdestilliert.

Peptidsynthese mit Chlorkohlensäureäthylester

10 mMol Cbo-aminosäure werden in 30 ccm absol. Chloroform suspendiert bzw. gelöst und mit 1,4 ccm (10 mMol) Triäthylamin versetzt. Die Cbo-aminosäure löst sich dabei als Triäthylammoniumsalz. Dann wird mit Eis/Kochsalz auf -10° abgekühlt und langsam 1,0 ccm (10mMol) Chlorkohlensäureäthylester zugetropft. Nach 20 Min. Rühren bei -10° hat sich das gemischte Anhydrid gebildet. Man gibt nun auf einmal eine vorgekühlte Lösung von 10 mMol Aminosäure- bzw. Peptidesterhydrohalogenid und 10 mMol Triäthylamin in 20 ccm Chloroform zu. Die Reaktionsmischung wird langsam auf Zimmertemperatur erwärmt und noch einige Stunden gerührt.

Zur Aufarbeitung wird mit Wasser, verd. HCl, Wasser, Bikarbonat und wieder Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Chloroform i. Vak. abdestilliert.

Peptidsynthese mit DCCI (Sheehan-Methode)

10 mMol Cbo-aminosäure oder Cbo-peptid und 10 mMol Aminosäure- bzw. Peptidester (aus 10 mMol Hydrohalogenid und 1,4 ccm Triäthylamin im entsprechenden Lösungsmittel) werden in 50 ccm absol. Chloroform, Methylenchlorid oder Tetrahydrofuran gelöst. Diese Lösung wird auf -10° gekühlt und mit 11 mMol DCCI versetzt. Es wird nun mehrere Stunden bei -10° gerührt, wobei allmählich Dicyclohexylharnstoff ausfällt, langsam auf Zimmertemperatur erwärmt und noch einige Zeit bei Zimmertemperatur belassen. Zur Aufarbeitung wird zunächst vom ausgefallenen Harnstoff abfiltriert und das Lösungsmittel vollständig abdestilliert. Der Rückstand wird in Chloroform aufgenommen, mit Wasser, verd. HCl, Wasser, Bikarbonat und wieder Wasser gewaschen, getrocknet und das Chloroform i. Vak. abdestilliert.

Peptidsynthese mit p-Nitrophenylestern

10 mMol Cbo-aminosäure- oder Cbo-peptid-p-nitrophenylester werden in 50 ccm Dimethylformamid mit 10 mMol Aminosäure- bzw. Peptidester (aus 10 mMol Hydrohalogenid und 1,4 ccm Triäthylamin) 1 bis 2 Tage bei Zimmertemperatur umgesetzt. Dann wird das Dimethylformamid i. Vak. vollständig abdestilliert, der Rückstand in Chloroform aufgenommen, mit Wasser, bis zum Verschwinden der gelben Farbe mit verd. Ammoniak, Wasser, verd. HCl und wieder Wasser gewaschen und ge-

trocknet.

Bei allen vier Methoden fällt meist das Reaktionsprodukt nach Abdestillieren des Lösungsmittels zunächst als Öl an und muß durch Behandeln mit geeigneten Lösungsmitteln zur Kristallisation gebracht werden.

Katalytische Abspaltung des Cbo-Benzyl- und p-Nitrobenzyl-restes

5 mMol geschütztes Peptid werden eventuell unter leichtem Erwärmen in 100 ccm Methanol gelöst, mit 10 ccm Eisessig (zur Abspaltung des Cbo-restes setzt man an Stelle des Eisessigs etwas Wasser zu) und 0,5g Palladium/Kohle (10% Degussa, Hanau) versetzt und in einer Hydrierungsapparatur 5 Stdn. hydriert. Danach wird vom Katalysator abfiltriert und zur Trockne verdampft. Dies wird zur restlosen Entfernung des Eisessigs sowie zur Entfernung von p-Toluidin (Wasserdampfdestillation) mehrmals mit 50% Alkohol wiederholt. Der jetzt meist feste Rückstand wird in absol. Alkohol suspendiert und abfiltriert.

L-Histidinmethylester 2HCl

Unter Rühren und Kühlen mit Eis/Kochsalz wurde in 50 ccm absol. Methanol langsam 3 ccm (40 mMol) Thionylchlorid getropft. Nach beendeter Zugabe wurden 3,1g (20 mMol) Histidin zugesetzt, langsam auf Zimmertemperatur erwärmt und über Nacht am Rückfluß erhitzt. Das Histidin ging zunächst als Monohydrochlorid in Lösung, fiel aber nach kurzer Zeit als Dihydrochlorid wieder aus. Dieses Dihydrochlorid löste sich nach

mehrstündigem Kochen unter SO_2-Entwicklung auf. Zur Aufarbeitung wurde das Methanol bis auf 20 ccm abdestilliert und mit Äther versetzt. Nach mehrstündigem Kühlen auf 0° wurde abfiltriert, mit Äther, Essigester und wieder Äther gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: nahezu quantitativ Schmp. 198-200°

$C_7H_{13}N_3O_2Cl_2$ 242,1

Auf dieselbe Weise kann ohne weiteres der 10-fache Ansatz gemacht werden.

Chromatographisch waren nur noch Spuren von nicht verestertem Histidin nachzuweisen.

L-Histidin-p-nitrobenzylesterdibenzolsulfonat (24)

Eine Suspension von 3,1g (20 mMol) fein gepulvertem Histidin, 9g (60 mMol) p-Nitrobenzylalkohol und 8g (50 mMol) Benzolsulfonsäure H_2O in 150 ccm Tetrachlorkohlenstoff wurde unter intensivem Rühren 2 Tage am Rückfluß erhitzt. Dabei wurde das Kondensat über mehrmals gewechseltem Silicagel/Soda getrocknet. Nach 2 Tagen wurde vom festen Rückstand abdekantiert, der Rückstand in 100 ccm Alkohol gelöst, mit Aktivkohle behandelt und abfiltriert. Dann wurde auf 30 ccm eingeengt und bis zur schwachen Trübung mit Äther versetzt. Im Eisschrank setzte bald Kristallisation ein. Umkristallisation aus Alkohol/Äther.

Ausbeute: 10,2g = 76,5% Schmp. 148-150°

$C_{25}H_{26}N_4O_{10}S_2$ 606,6 $N_{ber.}$ 9,19% $N_{gef.}$ 9,2%

Einwaage: 4,302mg $V_{korr.}$: 0,355 ccm (24,5°, 740 Torr)

Cbo-gly-gly-p-nitrophenylester

26,2g (0,1 Mol) Cbo-gly-gly (10) wurden in 200 ccm Pyridin gelöst, mit 16g p-Nitrophenol und bei 0° mit 21,5g DCCI versetzt. Nach 1 Std. bei 0° und 3 Stdn. bei Zimmertemperatur wurde vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und zur Trockne verdampft. Der feste Rückstand wurde in Alkohol suspendiert, abfiltriert und mit eiskaltem Alkohol gewaschen. Umkristallisation aus viel Alkohol.

Ausbeute: 29,3g = 76% Schmp. 158-160° (Lit. 159-160°)

$C_{18}H_{17}N_3O_7$ 387,3

Cbo-L-leucin-p-nitrobenzylester (23)

7,95g (30 mMol) Cbo-leu (86), 7,7g (45 mMol) p-Nitrobenzylchlorid und 6,3 ccm (45 mMol) Triäthylamin wurden in 50 ccm Essigester gelöst und 12 Stdn. am Rückfluß gekocht. Bereits nach 1/2 Std. begann Triäthylammoniumchlorid auszufallen. Nach 12 Stdn. wurde mit Wasser, verd. HCl, Wasser, Bikarbonat und wieder Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und auf 30 ccm eingeengt. Versetzen mit viel Petroläther ergab zunächst ein dunkles Öl, das jedoch rasch kristallisierte. Umkristallisation aus Äther/Petroläther

Ausbeute: 9,5g 79% Schmp. 62-64°

$C_{21}H_{24}N_2O_6$ 400,4 $N_{ber.}$ 7,00% $N_{gef.}$ 7,1%

Einwaage: 3,785mg $V_{korr.}$: 0,253ccm (25°, 732 Torr)

L-Leucin-p-nitrobenzylester HBr (23)

20g (50 mMol) Cbo-leu-pNB wurden in 100 ccm 2n HBr/Eisessig gelöst und 40 Min. bei Zimmertemperatur belassen. Dann wurde der Eisessig i. Vak. abdestilliert und der Rückstand in 50 ccm Essigester gelöst. Beim Versetzen mit Äther kristallisierte der p-Nitrobenzylester in verfilzten Nadeln aus. Umkristallisation aus Essigester/Äther.

Ausbeute: 14,5g = 83,5% Schmp. 130-132°

$C_{13}H_{19}N_2O_4Br$ 347,2 $N_{ber.}$ 8,07% $N_{gef.}$ 8,0%
Einwaage: 4,700mg $V_{korr.}$: 0,341ccm (27,5°, 733 Torr)

Cbo-leu-leu-pNB

7,95g (30mMol) Cbo-leu wurden mit 30 mMol Leu-pNB (aus 10,4g Leu-pNB HBr und 4,2 ccm Triäthylamin) in Chloroform nach der Mixed-Anhydrid-Methode umgesetzt. Die übliche Aufarbeitung ergab ein gelbes Öl, das nach Lösen in Essigester und Versetzen mit Petroläther in feinen Nadeln kristallisierte. Umkristallisation aus Essigester/Petroläther.

Ausbeute: 11,7g = 76% Schmp. 79-81°

$C_{27}H_{35}N_3O_7$ 513,55 $N_{ber.}$ 8,18% $N_{gef.}$ 8,2%
Einwaage: 4,201mg $V_{korr.}$: 0,316ccm (27,5°, 733 Torr)

Leu-leu-pNB HBr

10,3g (20 mMol) Cbo-leu-leu-pNB wurden in 50 ccm 2n HBr/Eisessig gelöst. Nach 40 Min. bei Zimmertemperatur wurde der Eisessig i. Vak. abdestilliert und der bräunliche Rückstand in 50 ccm Essigester gelöst.

Bei Zugabe von Äther kristallisierte das Hydrobromid in feinen Nadeln aus.

Ausbeute: 7,8g = 85% Schmp. 142-144°

$C_{19}H_{30}N_3O_5Br$ 460,3 $N_{ber.}$ 9,13% $N_{gef.}$ 9,3%
Einwaage: 3,412mg $V_{korr.}$: 0,286ccm (23,5°, 730 Torr)

Cbo-leu-leu-leu-pNB

5,3g (20 mMol) Cbo-leu wurden mit 9,2g (20 mMol) Leu-leu-pNB in Chloroform nach der Mixed-Anhydrid-Methode umgesetzt. Übliche Aufarbeitung ergab ein gelbes Öl, das über Petroläther allmählich erstarrte. Mehrmalige Umkristallisation aus Essigester/Petroläther.

Ausbeute: 10,5g = 84% Schmp. 128-130°

$C_{33}H_{46}N_4O_8$ 626,7 $N_{ber.}$ 8,93% $N_{gef.}$ 9,0%
Einwaage: 3,787mg $V_{korr.}$: 0,314ccm (29,5°, 732 Torr)

Leu-leu-leu-pNB HBr

9,4g (15 mMol) Cbo-leu-leu-leu-pNB wurden 40 Min. mit 50 ccm 2n HBr/Eisessig behandelt, anschließend der Eisessig i. Vak. abdestilliert und der Rückstand mit absol. Äther versetzt. Das Hydrobromid fiel sofort als amorphe schwach gelbliche Masse aus. Es wurde abfiltriert und gut mit absol. Äther gewaschen. Es gelang nicht, das Hydrobromid zu kristallisieren. Umfällung aus Essigester/Äther.

Ausbeute: 6,8g = 81% kein def. Schmp.

$C_{25}H_{41}N_4O_6$ 573,5 $N_{ber.}$ 9,77% $N_{gef.}$ 9,7%
Einwaage: 4,388mg $V_{korr.}$: 0,387ccm (24,5°, 730 Torr)

2. Synthese der einzelnen Peptide

Leu-his

Cbo-leu-his-pNB

3,9g (10 mMol) Cbo-leu-pNP und 10 mMol His-pNB (aus 6,1g Dibenzolsulfonat und 2,8 ccm Triäthylamin) wurden in Dimethylformamid 2 Tage bei Zimmertemperatur umgesetzt. Danach wurde das Dimethylformamid i. Vak. abdestilliert und der Rückstand in Chloroform aufgenommen. Die übliche Aufarbeitung ergab eine feste amorphe Masse, die aus Essigester/Petroläther kristallisierte. Umkristallisation aus Essigester/Petroläther.

Ausbeute: 5,1g = 95% Schmp. 105-107°

$C_{27}H_{31}N_5O_7$ 537,5 $N_{ber.}$ 13,01% $N_{gef.}$ 13,0%
Einwaage: 4,399mg $V_{korr.}$: 0,510ccm (23°, 740 Torr)

Leu-his $2H_2O$

8,1g (15 mMol) Cbo-leu-his-pNB wurden in Methanol/Eisessig hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde zur Trockne verdampft und dies zur Entfernung des Eisessigs noch mehrmals mit 50% Alkohol wiederholt. Dann wurde das gelbbraune Öl in absol. Alkohol gelöst. Nach einiger Zeit schied sich das Peptid kristallin ab. Umkristallisation aus Alkohol/Wasser.

Ausbeute: 4,0g = 88% Schmp. 173-175° Zers.

$C_{12}H_{24}N_4O_5$ 304,3 $N_{ber.}$ 18,39% $N_{gef.}$ 18,5%
Einwaage: 3,718mg $V_{korr.}$: 0,628ccm (25,5°, 728 Torr)

His-leu

Cbo-his-leu-pNB

6,05g (20 mMol) Cbo-his-hydrazid wurden wie üblich in das Azid überführt und mit 20 mMol Leu-pNB (aus 7g Hydrobromid und 2,8 ccm Triäthylamin) in Chloroform umgesetzt. Nach 5 Stdn. bei 0° und 12 Stdn. bei Zimmertemperatur wurde mit Wasser, Bikarbonat und wieder Wasser gewaschen, getrocknet und das Chloroform i. Vak. abdestilliert. Das gelbliche Öl wurde in Essigester gelöst und bis zur Trübung mit Petroläther versetzt. Es kristallisierte allmählich der p-Nitrobenzylester aus. Umkristallisation aus Essigester/ wenig Petroläther.

Ausbeute: 4,3g = 40% Schmp. 132-134°

$C_{27}H_{31}N_5O_7$ 537,5 $N_{ber.}$ 13,03% $N_{gef.}$ 13,0%
Einwaage: 4,228mg $V_{korr.}$: 0,500ccm (26°, 734 Torr)

His-leu

6g (11,15 mMol) Cbo-his-leu-pNB wurden in Methanol/Eisessig hydriert. Übliche Aufarbeitung ergab einen festen Rückstand. Dieser wurde in absol. Alkohol suspendiert und abfiltriert. Umkristallisation aus Wasser.

Ausbeute: 2,6g = 87% Schmp. 220-222° Zers.

$C_{12}H_{20}N_4O_3$ 268,3 $N_{ber.}$ 20,87% $N_{gef.}$ 20,8%
Einwaage: 2,992mg $V_{korr.}$: 0,560ccm (23°, 733 Torr)

Gly-his

Cbo-gly-his-pNB

10 mMol Cbo-gly-pNP und 10 mMol His-pNB (aus 10 mMol Dibenzolsulfonat und 2,8 ccm Triäthylamin) wurden in Dimethylformamid umgesetzt. Zur Aufarbeitung wurde das Dimethylformamid abdestilliert und der Rückstand in Chloroform aufgenommen. Waschen mit Wasser und verd. Ammoniak bis zum Verschwinden der gelben Farbe, Trocknen und Abdestillieren des Chloroforms ergab einen festen Rückstand, der aus Essigester/Petroläther kristallisierte. Das bräunliche Rohprodukt wurde in heißem Essigester gelöst, mit Aktivkohle behandelt und mit Petroläther der Ester wieder gefällt.

Ausbeute: 4,2g = 87,5% Schmp. 131-133°

$C_{23}H_{23}N_5O_7$ 481,4 $N_{ber.}$ 14,51% $N_{gef.}$ 14,5%
Einwaage: 3,861mg $V_{korr.}$: 0,500ccm (25°, 743 Torr)

Gly-his

3,5g (7,3 mMol) Cbo-gly-his-pNB wurden in Methanol/Eisessig hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde zur Trockne verdampft und dies zur Entfernung des Eisessigs mit 50% Alkohol wiederholt. Der ölige Rückstand wurde dann mit absol. Alkohol versetzt. Das sich fest abscheidende Peptid wurde abfiltriert und getrocknet. Das rohe Peptid wurde nun in 20 ccm Wasser gelöst, mit Aktivkohle entfärbt und auf 2 ccm eingeengt. Durch Zugabe von viel absol. Alkohol erstarrte das sich zunächst abscheidende Öl zu einer festen Masse. Abfiltrieren und Trocknen ergab ein leicht gel-

bes hygroskopisches Pulver.

Ausbeute: 1,2g = 77,5%

$C_8H_{12}N_4O_3$ 212,2 $N_{ber.}$ 26,38% $N_{gef.}$ 21,5%

Gly-gly-his

Cbo-gly-gly-his-pNB

3,9g (10 mMol) Cbo-gly-gly-pNP und 10 mMol His-pNB (aus 6,1g Dibenzolsulfonat und 2,8 ccm Triäthylamin) wurden in Dimethylformamid umgesetzt. Nach 12 Stdn. bei Zimmertemperatur wurde das Dimethylformamid i. Vak. abdestilliert und der Rückstand mit viel Wasser versetzt. Es kristallisierte dabei der p-Nitrobenzylester zusammen mit p-Nitrophenol aus. Es wurde abfiltriert und zur Entfernung des p-Nitrophenols mehrmals mit verd. Ammoniak gewaschen. Zweimalige Umkristallisation aus Pyridin/Wasser ergab feine Nadeln.

Ausbeute: 4,3g = 80% Schmp. 188-189°

$C_{25}H_{26}N_6O_8$ 538,5 $N_{ber.}$ 15,59% $N_{gef.}$ 15,6%
Einwaage: 4,002mg $V_{korr.}$: 0,570ccm (25,5°, 728 Torr)

Gly-gly-his

2g (3,7 mMol) Cbo-gly-gly-his-pNB wurden in Methanol/Wasser hydriert. Übliche Aufarbeitung ergab einen glasartigen Rückstand, der auch durch Zugabe von absol. Alkohol nicht fest wurde. Lösen in wenig Wasser und Versetzen mit Alkohol bis zur Trübung ergab stets nur eine ölige Abscheidung. Chromatographisch zeigten sich wie bei Gly-his zwei Substanzen.

Leu-leu-his

Cbo-leu-leu-his-methylester

3,8g (10 mMol) Cbo-leu-leu (10) wurden in 30 ccm Methylenchlorid gelöst und auf -10° gekühlt. Dann wurde eine Lösung von 10 mMol His-methylester (aus 2,6g Dihydrochlorid und 2,8 ccm Triäthylamin) in 20 ccm Chloroform und 2,1g (10 mMol) DCCI zugegeben und noch 4 Stdn. bei -10° und 12 Stdn. bei Zimmertemperatur gerührt. Dann wurde der ausgefallene Harnstoff abfiltriert, das Filtrat mit Wasser, mehrmals mit Bikarbonat und wieder Wasser gewaschen, getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. Das zurückbleibende Öl wurde mit Essigester versetzt und der sich bildende gallertige Niederschlag abfiltriert. Umkristallisation aus wenig Methanol/Essigester.

Ausbeute: 2,8g = 53% Schmp. 160-162°

$C_{27}H_{39}N_5O_6$ 529,6 $N_{ber.}$ 13,24% $N_{gef.}$ 13,3%
Einwaage: 5,70mg Verbr. 0,01n HCl: 2,70 ccm

Cbo-leu-leu-his

2,4g (4 mMol) Cbo-leu-leu-his-methylester wurden in Dioxan/Wasser mit 20% Überschuß an 2n Natronlauge verseift. Nach Neutalisieren mit 1n HCl wurde zur Trockne verdampft, mit absol. Alkohol behandelt und vom ungelösten Kochsalz abfiltriert. Es wurde vergeblich versucht, den öligen Rückstand zu kristallisieren.

Leu-leu-his

Das Verseifungsprodukt aus 4 mMol Cbo-leu-leu-his-methylester wurde in üblicher Weise in Methanol/Wasser

hydriert. Nach 5 Stdn. wurde vom Katalysator abfiltriert und zur Trockne verdampft. Der schön kristalline Rückstand wurde in wenig absol. Alkohol suspendiert und abfiltriert.

Ausbeute: 1,0g = 66% Schmp. 220-222° Zers.

$C_{18}H_{31}N_5O_4$ 381,4 $N_{ber.}$ 18,36% $N_{gef.}$ 18,2%
Einwaage: 6,28mg Verbr. 0,01n HCl: 3,92 ccm

His-leu-leu

Cbo-his-leu-leu-pNB

Nach dem üblichen Verfahren wurden 3,05g (10 mMol) Cbo-his-hydrazid in das Azid überführt und mit 10 mMol Leu-leu-pNB (aus 4,6g Hydrobromid und 1,4 ccm Triäthylamin) in Chloroform umgesetzt. Die übliche Aufarbeitung ergab ein gelbes Öl. Es wurde in Essigester gelöst und bis zur Trübung mit Petroläther versetzt. Es schied sich allmählich der p-Nitrobenzylester als Gallerte ab. Sie wurde abfiltriert und aus Essigester/Äther umgefällt.

Ausbeute: 2,6g = 40% Schmp. 158-160°

$C_{33}H_{42}N_6O_8$ 650,7 $N_{ber.}$ 12,92% $N_{gef.}$ 13,0%
Einwaage: 3,728mg $V_{korr.}$: 0,433ccm (23°, 740 Torr)

His-leu-leu

2,4g (3,7 mMol) Cbo-his-leu-leu-pNB wurden in Methanol/Wasser hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde zur Trockne verdampft. Der feste Rückstand wurde in Wasser, das etwas Alkohol enthielt,

gelöst und das Peptid durch Zugabe von viel Alkohol gefällt.

Ausbeute: 1,0g = 82% Schmp. 215-217° Zers.

$C_{18}H_{31}N_5O_4$ 381,4 $N_{ber.}$ 18,37% $N_{gef.}$ 18,4%
Einwaage: 2,782mg $V_{korr.}$: 0,467ccm (25,5°, 729 Torr)

Leu-his-leu

Cbo-leu-his-leu-pNB

6,24g (15 mMol) Cbo-leu-his-hydrazid (10) wurden in 90 ccm 0,5n HCl gelöst. Bei -5° wurde dann das Hydrazid durch Zugabe von 10 ccm einer Lösung von 14g Natriumnitrit in 100 ccm Wasser (20 mMol) in das Azid überführt. Nach 3 Min. wurde die Azidlösung mit einer vorgekühlten Lösung von 6,3 ccm Triäthylamin und 5,2g Leu-leu-pNB HBr in 100 ccm Chloroform versetzt. Das Zweiphasensystem wurde nun mehrere Stdn. bei 0° und über Nacht bei Zimmertemperatur intensiv gerührt. Dann wurde die Chloroformschicht abgetrennt, mit Bikarbonat und Wasser gewaschen, getrocknet und das Chloroform abdestilliert. Das braune Öl wurde in Essigester gelöst und bis zur beginnenden Trübung mit Petroläther versetzt. Im Kühlschrank kristallisierte allmählich der p-Nitrobenzylester aus. Umkristallisation aus Essigester/Petroläther, dann aus reinem Essigester.

Ausbeute: 6,4g = 65,5% Schmp. 103-105°

$C_{33}H_{42}N_6O_8$ 650,7 $N_{ber.}$ 12,92% $N_{gef.}$ 13,0%
Einwaage: 3,728mg $V_{korr.}$: 0,433ccm (23°, 740 Torr)

Leu-his-leu

4,1g (6,3 mMol) Cbo-leu-his-leu-pNB wurden in Methanol/Wasser hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde zur Trockne verdampft, der feste Rückstand in absol. Alkohol suspendiert und abfiltriert. Lösen in heißem Wasser und langsames Eindunsten ergab kristallines Peptid.

Ausbeute: 1,7g = 71% Schmp. 210-215° Zers.

$C_{18}H_{31}N_5O_4$ 381,4 $N_{ber.}$ 18,36% $N_{gef.}$ 18,3%
Einwaage: 4,829mg $V_{korr.}$: 0,800ccm (26°, 734 Torr)

His-his-leu

His-leu-pNB 2HBr (23)

7,25g (13,5 mMol) Cbo-his-leu-pNB wurden in 50 ccm 2n HBr/Eisessig gelöst. Nach 40 Min. bei Zimmertemperatur wurde der Eisessig abdestilliert und das zurückbleibende Öl mit absol. Äther behandelt. Es bildete sich sofort ein körniger Niederschlag. Er wurde abfiltriert, mehrmals mit absol. Äther gewaschen, kurz trockengesaugt und sofort in den Exsiccator überführt. Es wurde vergeblich versucht, das Hydrobromid kristallin zu erhalten. Amorphes, gelbes, hygroskopisches Pulver.

Ausbeute: 7,o g = 91,5% Schmp. 125-130°

$C_{19}H_{27}N_5O_5Br_2$ 565,2 $N_{ber.}$ 12,38% $N_{gef.}$ 12,4%
Einwaage: 3,566mg $V_{korr.}$: 0,401ccm (24,5°, 732 Torr)

Cbo-his-his-leu-pNB

3,03g (10 mMol) Cbo-his-hydrazid wurden wie üblich

in das Azid überführt und mit 10 mMol His-leu-pNB (aus 5,7g Dihydrobromid und 2,8 ccm Triäthylamin) in Chloroform umgesetzt. Nach 2 Stdn. bei 0° und 12 Stdn. bei Zimmertemperatur wurde wie üblich aufgearbeitet. Der Rückstand wurde in Essigester gelöst und mit Petroläther der p-Nitrobenzylester als Gallerte gefällt. Umfällung aus Essigester/Petroläther.

Ausbeute: 3,1g = 46% Schmp. 164-166°

$C_{33}H_{38}N_8O_8$ 674,6 $N_{ber.}$ 16,6% $N_{gef.}$ 16,7%
Einwaage: 3,818mg $V_{korr.}$: 0,580ccm (25°, 732 Torr)

His-his-leu

3,0g (4,45 mMol) Cbo-his-his-leu-pNB wurden in Methanol/Wasser hydriert. Übliche Aufarbeitung ergab einen Rückstand, der in absol. Alkohol suspendiert und abfiltriert wurde. Umkristallisation aus wenig heißem Wasser/Alkohol.

Ausbeute: 1,3g = 72% Schmp. 175-180° Zers.

$C_{18}H_{27}N_7O_4$ 405,4 $N_{ber.}$ 24,19% $N_{gef.}$ 24,1%
Einwaage: 3,779mg $V_{korr.}$: 0,826ccm (24°, 729 Torr)

His-leu-his

Leu-his-pNB

8,1g (15 mMol) Cbo-leu-his-pNB wurden in 100 ccm 2n HBr/Eisessig gelöst. Nach 30 Min. bei Zimmertemperatur wurde der größte Teil des Eisessigs bei 40° i. Vak. abdestilliert und der Rückstand mit Wasser versetzt. Die wässrige Phase wurde 2x mit je 100 ccm

Äther extrahiert und dann mit einem Überschuß an gesättigter Bikarbonatlösung versetzt. Der ölig ausfallende Ester wurde mit viel warmem Chloroform extrahiert. Die Extrakte wurden getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde in 100 ccm Chloroform aufgenommen, von wenig Ungelöstem abfiltriert und ohne weitere Reinigung weiterverarbeitet.

Ausbeute: 4,3g = 71%

$C_{19}H_{25}N_5O_5$ 403,4

Cbo-his-leu-his-pNB

3,1g (10 mMol) Cbo-his-hydrazid wurden in 30 ccm 1n HCl gelöst und unter Kühlen mit einer Lösung von 0,9g (13 mMol) Natriumnitrit in 10 ccm Wasser versetzt. Nach 3 Min. wurde mit einer vorgekühlten Lösung von 10 mMol Leu-his-pNB in 100 ccm Chloroform, die 2,8 ccm Triäthylamin enthielt, versetzt. Das Zweiphasensystem wurde mehrere Stdn. bei 0° und über Nacht bei Zimmertemperatur gerührt. Der Ester schied sich dabei ab. Er wurde abfiltriert, mehrmals mit Chloroform gewaschen und getrocknet. Umkristallisation aus Pyridin/Wasser.

Ausbeute: 4,5g = 67% Schmp. 183-185°

$C_{33}H_{38}N_8O_8$ 674,6 $N_{ber.}$ 16,64% $N_{gef.}$ 16,6%
Einwaage: 3,408mg $V_{korr.}$: 0,515ccm (25°, 729 Torr)

His-leu-his

3,5g (5,4 mMol) Cbo-his-leu-his-pNB wurden in Methanol/Wasser hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde zur Trockne verdampft. Der hygroskopische Rückstand wurde jedoch über absol. Alkohol nicht

fest. Darauf wurde in möglichst wenig 90% Alkohol gelöst und das Peptid mit Aceton gefällt. Es wurde abzentrifugiert und zur restlosen Entfernung des p-Toluidins mehrmals mit Aceton und zuletzt mit Äther gewaschen.

Ausbeute: 1,4g = 64% Schmp. 185-190° Zers.

$C_{18}H_{27}N_7O_4$ 405,4 $N_{ber.}$ 24,19% $N_{gef.}$ 24,1%
Einwaage: 3,514mg $V_{korr.}$: 0,766ccm (25°, 734 Torr)

Gly-gly-phe

L-Phenylalaninbenzylesterbenzolsulfonat (53)

8,25g (50 mMol) L-Phenylalanin und 8,7g (55 mMol) Benzolsulfonsäure wurden in 100 ccm Benzylalkohol gelöst und bei 130° Badtemperatur der größte Teil des Benzylalkohols abdestilliert. Beim Abkühlen kristallisierte der Rückstand. Er wurde gut mit Äther verrieben und abfiltriert. Das rohe Benzolsulfonat sowie weitere 2g Benzolsulfonsäure wurden nun wieder in 100 ccm Benzylalkohol gelöst. Es wurde wieder der größte Teil abdestilliert, der rasch kristallisierende Rückstand gut mit Äther verrieben und abfiltriert.

Ausbeute: 18,7g = 90,5% Schmp. 160-165°

$C_{22}H_{23}NO_5S$ 413,5

Cbo-gly-gly-phe-benzylester

3,9g (10 mMol) Cbo-gly-gly-pNP und 10 mMol Phe-bz (aus 4,2g Benzolsulfonat und 1,4 ccm Triäthylamin)

wurden in 50 ccm Dimethylformamid 2 Tage bei Zimmertemperatur umgesetzt. Übliche Aufarbeitung ergab ein bräunliches Öl, das nach Lösen in Essigester und Versetzen mit Petroläther rasch kristallisierte. Umkristallisation aus Essigester/Petroläther.

Ausbeute: 3,7g = 73,5% Schmp. 122-124°

$C_{28}H_{29}N_3O_6$ 503,5 $N_{ber.}$ 8,35% $N_{gef.}$ 8,4%
Einwaage: 3,849mg $V_{korr.}$: 0,297ccm (29°, 732 Torr)

Gly-gly-phe

3g (6 mMol) Cbo-gly-gly-phe-bz wurden in Methanol/Eisessig hydriert. Übliche Aufarbeitung ergab einen öligen Rückstand, der beim Versetzen mit absol. Alkohol erstarrte. Das Peptid wurde in Alkohol suspendiert und abfiltriert. Umkristallisation aus Wasser/Alkohol.

Ausbeute: 1,2g = 72% Schmp. 215-216° Zers.

$C_{13}H_{17}N_3O_4$ 279,3 $N_{ber.}$ 15,03% $N_{gef.}$ 15,0%
Einwaage: 3,709mg $V_{korr.}$: 0,510ccm (28°, 732 Torr)

Gly-gly-val

Cbo-val-pNB

Aus 50 mMol L-Valin wurde nach VAUGHAN und EICHLER (85) Cbo-val hergestellt. Das farblose Öl wurde in 60 ccm Essigester gelöst und mit 12g (70 mMol) p-Nitrobenzylchlorid und 9,8 ccm (70 mMol) Triäthylamin 12 Stdn. am Rückfluß erhitzt. Dann wurde mit Wasser, verd. HCl, Wasser, Bikarbonat und wieder Wasser

gewaschen, getrocknet und auf 30 ccm eingeengt. Versetzen mit Petroläther ergab schöne nadelförmige Kristalle. Umkristallisation aus Essigester/Petroläther.

Ausbeute: 15,4g = 80% (bezogen auf eingesetztes L-Valin)

Schmp. 105-106°

$C_{20}H_{22}N_2O_6$ 386,4 $N_{ber.}$ 7,25% $N_{gef.}$ 7,3%

Einwaage: 4,235mg $V_{korr.}$: 0,281ccm (25°, 732 Torr)

Val-pNB HBr

13,5g (35 mMol) Cbo-val-pNB wurden in 100 ccm 2n HBr/Eisessig gelöst. Nach 30 Min. bei Zimmertemperatur wurde der Eisessig i. Vak. abdestilliert und der bräunliche, rasch kristallisierende Rückstand in 100 ccm Essigester suspendiert. Es wurde nun gerade so viel Methanol zugesetzt (einige ccm), daß in der Hitze eine klare Lösung entstand. Beim Abkühlen schied sich der p-Nitrobenzylester in schönen Nadeln ab. Zur Vervollständigung der Fällung wurde noch mit 100 ccm Äther versetzt, nach Kühlen im Eisschrank abfiltriert, zur Entfernung des Benzylbromids mehrmals mit Äther gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 11,3g = 97% Schmp. 150-151°

$C_{12}H_{17}N_2O_4Br$ 333,2 $N_{ber.}$ 8,41% $N_{gef.}$ 8,5%

Einwaage: 4,035mg $V_{korr.}$: 0,314ccm (28°, 732 Torr)

Cbo-gly-gly-val-pNB

3,9g (10 mMol) Cbo-gly-gly-pNP wurden in 50 ccm Dimethylformamid mit 10 mMol Val-pNB (aus 3,5g Val-pNB HBr und 1,4 ccm Triäthylamin) umgesetzt. Nach zweitägigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde wie

üblich aufgearbeitet. Der bräunliche Rückstand wurde in wenig Essigester gelöst und bis zur Trübung mit Petroläther versetzt. Der p-Nitrobenzylester kristallisierte über Nacht im Kühlschrank. Umkristallisation aus Essigester/Petroläther.

Ausbeute: 4,5g = 90% Schmp. 106-108°

$C_{24}H_{28}N_4O_8$ 500,5 $N_{ber.}$ 11,19% $N_{gef.}$ 11,3%
Einwaage: 4,039mg $V_{korr.}$: 0,412ccm (23°, 730 Torr)

Gly-gly-val

4,1g (8,2 mMol) Cbo-gly-gly-val-pNB wurden in Methanol/Eisessig hydriert und wie gewöhnlich aufgearbeitet. Umkristallisation aus Wasser/Alkohol.

Ausbeute: 1,65g = 87% Schmp. 215-217° Zers.

$C_9H_{17}N_3O_4$ 231,2 $N_{ber.}$ 18,19% $N_{gef.}$ 18,3%
Einwaage: 2,730mg $V_{korr.}$: 0,447ccm (23°, 737 Torr)

Leu-leu-val

Cbo-leu-leu-val-pNB

3,8g (10 mMol) Cbo-leu-leu (10) wurden in Methylenchlorid mit 10 mMol Val-pNB (aus 3,4g Hydrobromid und 1,4 ccm Triäthylamin) nach der Sheehan-Methode mit DCCI umgesetzt. Nach Abfiltrieren des Dicyclohexylharnstoffs wurde mit Wasser, Bikarbonat, Wasser, verd. HCl und wieder Wasser gewaschen, getrocknet und das Methylenchlorid abdestilliert. Das zurückbleibende

Öl kristallisierte aus Essigester/Petroläther. Umkristallisation aus Essigester/Petroläther.

Ausbeute: 5,3g = 86,5% Schmp. 143-145°

$C_{32}H_{44}N_4O_8$ 612,7 $N_{ber.}$ 9,09% $N_{gef.}$ 9,15%

Einwaage: 3,505mg $V_{korr.}$: 0,288ccm (23°, 733 Torr)

Leu-leu-val

4,3g (7 mMol) Cbo-leu-leu-val-pNB wurden in Methanol/Eisessig hydriert und wie gewöhnlich aufgearbeitet.

Ausbeute: 1,9g = 79% kein def. Schmp.

$C_{17}H_{33}N_3O_4$ 343,4 $N_{ber.}$ 12,23% $N_{gef.}$ 12,2%

Einwaage: 3,008mg $V_{korr.}$: 0,335ccm (26°, 728 Torr)

Val-leu-leu

Cbo-val-pNP (87)

5g (20 mMol) Cbo-val und 3g p-Nitrophenol wurden in 50 ccm Essigester gelöst und bei 0° mit 4,5g DCCI versetzt. Nach 1 Std. bei 0° und 12 Stdn. bei Zimmertemperatur wurde der ausgefallene Harnstoff abfiltriert, das Filtrat mehrmals mit Bikarbonat und anschließend mit Wasser gewaschen, getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. Das intensiv gelb gefärbte Öl wurde in Äther gelöst und bis zur Trübung mit Petroläther versetzt. Im Kühlschrank kristallisierte allmählich der p-Nitrophenylester in schönen Nadeln aus. Umkristallisation aus Äther/Petroläther.

Ausbeute: 4,6g = 60% Schmp. 93-94°

$C_{19}H_{20}N_2O_6$ 372,35

Cbo-val-leu-leu-pNB

3,7g (10 mMol) Cbo-val-pNP wurden in Chloroform mit 10 mMol Leu-leu-pNB umgesetzt. Nach 2 Tagen bei Zimmertemperatur wurde wie üblich aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde in Essigester gelöst und mit Petroläther der p-Nitrobenzylester gefällt. Umkristallisation aus Essigester/Petroläther.

Ausbeute: 4,1g = 67% Schmp. 149-151°

$C_{32}H_{44}N_4O_8$ 612,7 $N_{ber.}$ 9,15% $N_{gef.}$ 9,2%
Einwaage: 4,213mg $V_{korr.}$: 0,356ccm (29°, 732 Torr)

Val-leu-leu

1,55g (2,5 mMol) Cbo-val-leu-leu-pNB wurden in Methanol/Eisessig hydriert. Übliche Aufarbeitung ergab ein Öl, das beim Versetzen mit absol. Alkohol kristallisierte. Es wurde abfiltriert und mehrmals mit Alkohol gewaschen.

Ausbeute: 0,6g = 70% kein def. Schmp.

$C_{17}H_{33}N_3O_4$ 343,4 $N_{ber.}$ 12,24% $N_{gef.}$ 12,3%
Einwaage: 3,620mg $V_{korr.}$: 0,402ccm (25°, 735 Torr)

Leu-val-leu

Cbo-val-leu-pNB

5,6g (15 mMol) Cbo-val-pNP und 15 mMol Leu-pNB (aus 5,2g Hydrobromid und 2,1 ccm Triäthylamin) wurden 2 Tage in Dimethylformamid umgesetzt. Übliche Aufarbeitung ergab ein gelbliches Öl, das aus Essig-

ester/Petroläther rasch kristallisierte. Umkristallisation aus Essigester/Petroläther.

Ausbeute: 6,7g = 89,5% Schmp. 118-119°

$C_{26}H_{33}N_3O_7$ 499,5 $N_{ber.}$ 8,41% $N_{gef.}$ 8,4%
Einwaage: 3,257mg $V_{korr.}$: 0,245ccm (25°, 740 Torr)

Val-leu-pNB HBr

6,2g (12,4 mMol) Cbo-val-leu-pNB wurden in 100 ccm HBr/Eisessig gelöst und 30 Min. bei Zimmertemperatur belassen. Dann wurde bei möglichst niederer Temperatur der Eisessig abdestilliert und der Rückstand mit viel Äther versetzt. Das Hydrobromid fiel zunächst als Öl aus und setzte sich an der Wand fest. Der Äther wurde abgegossen und das Öl mit wenig Essigester versetzt. Es löste sich zunächst der größte Teil, dann trat plötzlich Kristallisation ein. Umkristallisation aus Essigester/Äther.

Ausbeute: 5,3g = 96% Schmp. 154-156°

$C_{18}H_{28}N_3O_5Br$ 446,3 $N_{ber.}$ 9,43% $N_{gef.}$ 9,4%
Einwaage: 3,847mg $V_{korr.}$: 0,324ccm (24°, 740 Torr)

Cbo-leu-val-leu-pNB

3,9g (10 mMol) Cbo-leu-pNP (10) wurden in Dimethylformamid mit 10 mMol Val-leu-pNB (aus 4,5g Hydrobromid und 1,4 ccm Triäthylamin) umgesetzt. Das nach der üblichen Aufarbeitung anfallende Öl wurde in Essigester aufgenommen und bis zur Trübung mit Petroläther versetzt. Es kristallisierte allmählich der p-Nitrobenzylester aus. Umkristallisation aus

Essigester/Petroläther.

Ausbeute: 5,2g = 85% Schmp. 163-164°

$C_{32}H_{44}N_4O_8$ 612,7 $N_{ber.}$ 9,09% $N_{gef.}$ 9,1%
Einwaage: 3,423mg $V_{korr.}$: 0,281ccm (23°, 733 Torr)

Leu-val-leu

4,9g (8 mMol) Cbo-leu-val-leu-pNB wurden in Methanol/Eisessig hydriert. Übliche Aufarbeitung ergab einen festen Rückstand. Dieser wurde in Alkohol suspendiert und unter Erhitzen durch Zugabe von wenig Wasser in Lösung gebracht. Beim Abkühlen kristallisierte das Peptid in kleinen Plättchen aus. Umkristallisation aus Wasser/Alkohol.

Ausbeute: 2,2g = 80% kein def. Schmp.

$C_{17}H_{33}N_3O_4$ 343,4 $N_{ber.}$ 12,23% $N_{gef.}$ 12,3%
Einwaage: 4,518mg $V_{korr.}$: 0,509ccm (26,5°, 728 Torr)

Ser-leu-leu

Cbo-ser-leu-leu-pNB

1,75g (7 mMol) Cbo-ser-hydrazid (54,65) wurden in 30 ccm Wasser suspendiert. Nach Zugabe von 1,5 ccm Eisessig und 1 ccm conc. HCl entstand eine klare Lösung. Unter Kühlen und Schütteln wurde nun eine Lösung von 0,75g (10 mMol) Natriumnitrit in 5 ccm Wasser langsam zugetropft. Das ölige Azid wurde in 100 ccm Essigester aufgenommen, rasch mit eiskaltem Wasser, Bikarbonat und wieder Wasser gewaschen und getrocknet. Die trokkene Lösung des Azids wurde nun zu einer Lösung von

7,5 mMol Leu-leu-pNB (aus 3,5g Hydrobromid und 1,05 ccm Triäthylamin) in 30 ccm Chloroform filtriert. Dabei fiel Triäthylammoniumbromid aus. Nach 24 Stdn. bei Zimmertemperatur wurde die Mischung mit Wasser, verd. HCl, Wasser, Bikarbonat und wieder Wasser gewaschen, getrocknet und auf ein kleines Volumen eingeengt. Versetzen mit Petroläther ergab schöne Kristalle. Umkristallisation aus Essigester/Petroläther.

Ausbeute: 2,8g = 67% Schmp. 159-160°

$C_{30}H_{40}N_4O_9$ 600,6 $N_{ber.}$ 9,33% $N_{gef.}$ 9,35%
Einwaage: 4,238mg $V_{korr.}$: 0,364 ccm (29,5°, 732 Torr)

Ser-leu-leu

2,2g (3,66 mMol) Cbo-ser-leu-leu-pNB wurden in Methanol/Eisessig hydriert und wie üblich aufgearbeitet.

Ausbeute: 1,0g = 83% Schmp. 225-227° Zers.

$C_{15}H_{29}N_3O_5$ 331,4 $N_{ber.}$ 12,67% $N_{gef.}$ 12,6%
Einwaage: 3,708mg $V_{korr.}$: 0,427 ccm (27,5°, 732 Torr)

D-leu-leu-leu

Cbo-D-Leucin

Darstellung analog Cbo-L-leucin (86)

Ausbeute: 85%

$C_{14}H_{19}NO_4$ 265,3

Cbo-D-leu-leu-leu-pNB

10 mMol Cbo-D-leu wurden nach der Mixed-Anhydrid-Methode mit 10 mMol Leu-leu-pNB (aus 4,6g Hydrobromid und 1,4 ccm Triäthylamin) in Chloroform umgesetzt. Übliche Aufarbeitung ergab ein nicht kristallisierendes Öl.

Ausbeute: 5,2g = 83%

$C_{33}H_{46}N_4O_8$ 626,7

D-leu-leu-leu

5,2g öliger Cbo-D-leu-leu-leu-pNB wurden in Methanol/Eisessig hydriert. Übliche Aufarbeitung ergab einen festen Rückstand. Dieser wurde in absol. Alkohol suspendiert und abfiltriert.

Ausbeute: 2,1g = 71% Schmp. 234-235° Zers.

$C_{18}H_{35}N_3O_4$ 357,5 $N_{ber.}$ 11,77% $N_{gef.}$ 11,8%
Einwaage: 3,083mg $V_{korr.}$: 0,325 ccm (23,5°, 737 Torr)

Leu-leu-D-leu

Cbo-D-leu-pNB

Darstellung analog Cbo-leu-pNB (23)

Ausbeute: 69% Schmp. 62-64°

$C_{21}H_{24}N_2O_6$ 400,4

D-leu-pNB HBr

Darstellung analog Leu-pNB HBr (28).

Ausbeute: 5,4g = 70% Schmp. 180-182°

$C_{12}H_{16}N_2O_4Br$ Mr 1.2

Cbo-leu-leu-D-leu-pNB

5,8g (10 mMol) Cbo-leu-leu (2) wurden in 30 ccm Methylenchlorid gelöst, mit einer Lösung von 1,4 ccm Triäthylamin und 3,4g (10 mMol) D-Leu-pNB HBr in 30 ccm Methylenchlorid versetzt und auf -5° gekühlt. Dann wurden 2,4g (11 mMol) DCCI zugesetzt, mehrere Stdn. bei -5° und über Nacht bei Zimmertemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wurde vom Harnstoff abfiltriert, mit verd. HCl und Bikarbonat gewaschen, getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. Der Rückstand wurde in Essigester aufgenommen und vom unlöslichen restlichem Harnstoff abfiltriert. Der Ester kristallisierte nicht.

Ausbeute: 4,8g = 77%

$C_{33}H_{46}N_4O_8$ ber.?

Leu-leu-D-leu

4,8g (7,7 mMol) öliger Cbo-leu-leu-D-leu-pNB wurden in Methanol/Eisessig hydriert. Übliche Aufarbeitung ergab einen festen Rückstand, der in Äthanol suspendiert und abfiltriert wurde.

Ausbeute: 2,1g = 76,4% Schmp. 215-220° Zers.

$C_{18}H_{34}N_4O_4$ 370,5 $N_{ber.}$ 15,1% $N_{gef.}$ 14,8%

Einwaage: 4,307mg $V_{korr.}$ 0,494 ccm (25°, 760 Torr)

ß-Ala-leu-leu

Cbo-ß-ala-leu-leu

2,25g (10 mMol) Cbo-ß-ala (52) wurden in 50 ccm Tetrahydrofuran suspendiert und unter Eis/Kochsalz-Kühlung erst mit 1,4 ccm Triäthylamin und dann mit 1,0 ccm Chlorameisensäureäthylester versetzt. Es schied sich rasch Triäthylammoniumchlorid ab. Nach 30 Min. Rühren bei -10° wurde auf einmal eine auf 0° vorgekühlte Lösung von 2,85g (10 mMol) Leu-leu 2 H_2O (10) und 1,4 ccm Triäthylamin in 25 ccm Wasser zugegeben. Dann wurde die Kühlung weggenommen, noch 2 Stdn. bei Zimmertemperatur gerührt, dann das Tetrahydrofuran abdestilliert und die zurückbleibende wässrige Phase angesäuert. Das sich abscheidende Öl wurde in Essigester aufgenommen, die Essigesterphase mit Wasser gewaschen, getrocknet und auf 20 ccm eingeengt. Beim Versetzen mit Petroläther schied sich ein Öl ab, das über Nacht im Eisschrank kristallisierte. Umkristallisation aus Essigester/Petroläther.

Ausbeute: 1,7g = 38% Schmp. 143-145°

$C_{23}H_{25}N_3O_6$ 449,5 $N_{ber.}$ 9,34% $N_{gef.}$ 9,3%

Cbo-ß-ala-leu-leu-pNB

2,25g (10 mMol) Cbo-ß-ala (52) und 10 mMol Leu-leu-pNB (aus 4,6g Hydrobromid und 1,4 ccm Triäthylamin in Chloroform) wurden nach der Mixed-Anhydrid-Methode in Chloroform umgesetzt. Übliche Aufarbeitung

ergab einen festen Rückstand, der aus Essigester/Petroläther in feinen Nadeln kristallisierte. Umkristallisation aus Essigester/Petroläther.

Ausbeute: 3,5g = 60% Schmp. 140-142°

$C_{30}H_{40}N_4O_8$ 584,6 $N_{ber.}$ 9,58% $N_{gef.}$ 9,5%
Einwaage: 4,214mg $V_{korr.}$: 0,356 ccm (25°, 734 Torr)

ß-Ala-leu-leu

Sowohl Hydrieren von Cbo-ß-ala-leu-leu in Methanol/Wasser, als auch Hydrieren von Cbo-ß-ala-leu-leu-pNB in Methanol/Eisessig ergab kristallines ß-Ala-leu-leu. Umkristallisation aus Wasser/Alkohol. Die Ausbeute war in beiden Fällen ungefähr gleich.

Ausbeute: um 80% Schmp. 245-248° Zers.

$C_{15}H_{29}N_3O_4$ 315,4 $N_{ber.}$ 13,32% $N_{gef.}$ 13,3%

ß-Ala-leu-leu-leu

Cbo-ß-ala-leu-leu-leu

Wie schon bei Cbo-ß-ala-leu-leu beschrieben, wurden 10 mMol Cbo-ß-ala (52) und 10 mMol Leu-leu-leu (10) in Tetrahydrofuran/Wasser umgesetzt. Beim Ansäuern schied sich eine schmierige Masse ab. Diese wurde in Essigester aufgenommen, mit Wasser gewaschen, getrocknet und der Essigester vollständig abdestilliert. Der Rückstand

wurde in Methanol gelöst und mit Wasser gefällt. Mehrmalige Umkristallisation aus 70% Methanol.

Ausbeute: 3,2g = 57% Schmp. 165-168°

$C_{29}H_{46}N_4O_7$ 562,7 $N_{ber.}$ 9,96% $N_{gef.}$ 10,0%
Einwaage: 5,90mg Verbr. 0,01n HCl: 2,10ccm

ß-Ala-leu-leu-leu

Cbo-ß-ala-leu-leu-leu wurde in Methanol/Wasser unter Zusatz von 5 ccm Eisessig hydriert. Der nach Aufarbeitung zurückbleibende Rückstand wurde in Alkohol suspendiert und abfiltriert. Umkristallisation aus viel 70% Alkohol. Feine verfilzte Nadeln.

Ausbeute: 84% kein def. Schmp.

$C_{21}H_{40}N_4O_5$ 428,5 $N_{ber.}$ 13,05% $N_{gef.}$ 13,0%

α-Glu-leu-leu

Cbo-glutaminsäureanhydrid

28g (0,1 Mol) Cbo-glu (84) wurde in 100 ccm Acetanhydrid unter Erwärmen auf 40° gelöst, 1 Std. bei Zimmertemperatur belassen und dann das Acetanhydrid i. Vak. bei 40-50° abdestilliert. Der klare ölige Rückstand wurde in 50 ccm warmem Chloroform gelöst und mit 150 ccm absol. Äther versetzt. Über Nacht schied sich im Kühlschrank das Anhydrid als feste Masse ab.

Ausbeute: 23g = 87,5% Schmp. 70-75°

$C_{13}H_{13}NO_5$ 263,2

Cbo-glu-α-benzylester-γ-DCA (28)

17g Cbo-glutaminsäureanhydrid wurden mit 8,2 ccm Benzylalkohol im geschlossenen Kolben 3 Stdn. auf 100° erhitzt. Das dicke Öl wurde in 200 ccm Äther aufgenommen und mit 0,5% Ammoniak, das 40g Ammoniumchlorid pro Liter enthielt, fraktionniert extrahiert. Es bildeten sich zunächst 3 Schichten, eine ölige, eine wässrige und eine ätherische. Nach Zugabe von ungefähr 160 ccm 0,5% Ammoniak verschwand die ölige Schicht. Die ätherische Phase enthielt jetzt den reinen α-Ester. Zu seiner Isolierung wurde mit 30 ccm 10% Ammoniak extrahiert, der Extrakt mit HCl angesäuert und das ausfallende Öl in wenig Äther aufgenommen. Die neutral gewaschene ätherische Lösung wurde getrocknet, auf 50 ccm eingeengt und mit 5 ccm Dicyclohexylamin versetzt. Es kristallisierte rasch das Dicyclohexylammoniumsalz des α-Benzylesters aus.

Zur Gewinnung weiteren α-Esters wurden die gesammelten Ammonsalzextrakte mit HCl angesäuert, das ausfallende Benzylestergemisch in Äther aufgenommen, mit Wasser neutral gewaschen und das Extraktionsverfahren wiederholt. Es wurden so weitere 3 Fraktionen gewonnen. Mehrmalige Umkristallisation aus Alkohol/Äther.

Ausbeute: 21,4g = 57% Schmp. 142-143°

$C_{32}H_{44}N_2O_6$ 552,7 $N_{ber.}$ 5,07% $N_{gef.}$ 5,1%

Cbo-glu-γ-benzylester-α-DCA (28)

Die gesammelten Ammonsalzextrakte der Darstellung des γ-DCA-Salzes wurden noch zweimal wie oben angegeben extrahiert und die ätherischen Extrakte, die noch α-Benzylester neben γ-Benzylester enthielten, verworfen. Dann wurden die Ammonsalzextrakte angesäuert, der ausfallende γ-Ester in Äther aufgenommen, mit Wasser neu-

tral gewaschen, getrocknet und auf 100 ccm eingeengt. Beim Versetzen mit 10 ccm Dicyclohexylamin fiel zunächst ein Öl aus, das aber bald kristallisierte. Das rohe α-DCA-Salz enthielt noch beträchtliche Mengen des γ-Isomeren. Löste man jedoch in Alkohol und gab viel Äther zu, so kristallisierte beim Animpfen zunächst reines α-Salz in langen Nadeln aus. Erst nach mehrtägigem Stehen im Eisschrank schied sich auch γ-Salz ab, erkenntlich an den sternförmigen Kristallen auf den Nadeln. Mehrmalige Umkristallisation aus Alkohol/Äther.

Ausbeute: 15,5g = 41% Schmp. 142-143°

$C_{32}H_{44}N_2O_6$ 552,7 $N_{ber.}$ 5,07% $N_{gef.}$ 5,1%

Cbo-glu-γ-benzylester

5,5g (10 mMol) Cbo-glu-γ-benzylester-α-DCA wurden fein pulverisiert in 100 ccm Essigester suspendiert, mit 5 ccm 4n HCl in Essigester versetzt und 1 Std. gerührt. Dann wurde vom ausgefallenen Dicyclohexylammoniumchlorid abfiltriert, das Filtrat mehrmals mit Wasser neutral gewaschen und getrocknet. Einengen und Versetzen mit Petroläther ergab trotz vieler Versuche nur ein Öl.

Ausbeute: 90%

$C_{20}H_{21}NO_6$ 371,4

Cbo-glu-γ-bz-α-leu-leu-pNB

Der oben erhaltene ölige Cbo-glu-γ-bz wurde in 50 ccm Essigester gelöst und mit 10 mMol Leu-leu-pNB in 20 ccm Chloroform nach der Sheehan-Methode umgesetzt. Übliche Aufarbeitung ergab einen gallertigen

Rückstand. Dieser wurde in heißem Essigester gelöst und bis zur Trübung mit Petroläther versetzt. Der Ester fiel trotz vieler Kristallisationsversuche immer als Gallerte an. Umfällung aus Essigester/Petroläther.

Ausbeute: 5,8g = 79% Schmp. 110-115°

$C_{39}H_{48}N_4O_{10}$ 732,8 $N_{ber.}$ 7,65% $N_{gef.}$ 7,7%
Einwaage: 4,093mg $V_{korr.}$: 0,286 ccm (25°, 733 Torr)

α-Glu-leu-leu

5,1g (7 mMol) Cbo-glu-γ-bz-α-leu-leu-pNB wurden in Methanol/Eisessig hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde zur Trockne verdampft und dies noch mehrmals zur Entfernung des Eisessigs mit 50% Alkohol wiederholt. Dann wurde das gelbe Öl in Alkohol gelöst. Aus dieser Lösung fiel über Nacht der größte Teil des Peptids in feinen Kristallen aus. Es wurde abfiltriert und gut mit Alkohol gewaschen.

Ausbeute: 2,1g = 80% Schmp. 235-237° Zers.

$C_{17}H_{31}N_3O_6$ 373,4 $N_{ber.}$ 11,24% $N_{gef.}$ 11,2%
Einwaage: 4,582mg $V_{korr.}$: 0,462 ccm (25°, 737 Torr)

α-Glu-leu-leu-leu

Cbo-glu-γ-bz-α-leu-leu-leu-pNB

Der aus 5,5g (10 mMol) Cbo-glu-γ-bz-α-DCA dargestellte freie Cbo-glu-γ-bz wurde in 50 ccm Essigester wie bei α-glu-leu-leu beschrieben nach der Sheehan-

Methode mit 10 mMol Leu-leu-leu-pNB umgesetzt. Übliche Aufarbeitung ergab ein Öl, das nach Lösen in Essigester und Versetzen mit Petroläther bis zur leichten Trübung in stark verfilzten, schlecht filtrierbaren Nädelchen anfiel. Umkristallisation aus Essigester/Petroläther.

Ausbeute: 5,3g = 63% Schmp. 152-154°

$C_{45}H_{59}N_5O_{11}$ 845,9 $N_{ber.}$ 8,27% $N_{gef.}$ 8,2%
Einwaage: 5,249mg $V_{korr.}$: 0,385 ccm (23,5°, 738 Torr)

α-Glu-leu-leu-leu

5,07g (6 mMol) Cbo-glu-γ-bz-α-leu-leu-leu-pNB wurden wie üblich hydriert und aufgearbeitet.

Ausbeute: 2,3g = 79% Schmp. 240-242° Zers.

$C_{23}H_{42}N_4O_7$ 486,6 $N_{ber.}$ 11,46% $N_{gef.}$ 11,3%
Einwaage: 3,653mg $V_{korr.}$: 0,370 ccm (24°, 737 Torr)

γ-Glu-leu-leu

Cbo-glu-α-bz-γ-leu-leu-pNB

5,5g (10 mMol) Cbo-glu-α-bz-γ-DCA wurden wie das isomere Dicyclohexylammoniumsalz in die freie Säure überführt. Der ölige Cbo-glu-α-bz wurde in Tetrahydrofuran mit 10 mMol Leu-leu-pNB (aus 4,6g Hydrobromid und 1,4 ccm Triäthylamin in wenig Chloroform) nach der Sheehan-Methode umgesetzt. Nach Abfiltrieren des Harnstoffs wurde zur Trockne verdampft, der Rückstand in Essigester aufgenommen, mit Wasser, Bikarbonat, verd. HCl, Wasser gewaschen, getrocknet und eingeengt. Dann

wurde mit Petroläther bis zur Trübung versetzt. Es kristallisierte allmählich der p-Nitrophenylester aus. Mehrmalige Umkristallisation aus Essigester/Petroläther.

Ausbeute: 2,4g = 33% Schmp. 135-137°

$C_{39}H_{48}N_4O_{10}$ 734,8 $N_{ber.}$ 7,65% $N_{gef.}$ 7,8%
Einwaage: 5,175mg $V_{korr.}$: 0,369 ccm (27,5°, 732 Torr)

γ-Glu-leu-leu

1,8g (2,45 mMol) Cbo-glu-α-bz-γ-leu-leu-pNB wurden in Methanol/Eisessig hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde zur Trockne verdampft und dies mehrmals mit 50% Alkohol wiederholt. Dann wurde der Rückstand mit abs. Alkohol behandelt, das Peptid abfiltriert, mehrmals mit absol. Alkohol und zuletzt mit Äther gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 0,6g = 66% Schmp. 223-225° Zers.

$C_{17}H_{31}N_3O_6$ 373,4 $N_{ber.}$ 11,25% $N_{gef.}$ 11,3%
Einwaage: 4,966mg $V_{korr.}$: 0,510 ccm (25°, 730 Torr)

γ-Glu-leu-leu-leu

Cbo-glu-α-bz-γ-leu-leu-leu-pNB

10 mMol Cbo-glu-α-bz wurden wie bei γ-Glu-leu-leu beschrieben mit 10 mMol Leu-leu-leu-pNB (aus 5,8g Hydrobromid und 1,4 ccm Triäthylamin in wenig Chloroform) in Tetrahydrofuran umgesetzt. Nach Abfiltrieren

des Harnstoffs wurde zur Trockne verdampft. Der feste Rückstand wurde in heißem Essigester aufgenommen. Daraus kristallisierte über Nacht der gesuchte Ester aus. Umkristallisation aus Essigester.

Ausbeute: 3,5g = 41,5% Schmp. 190-195°

$C_{45}H_{59}N_5O_{11}$ 845,9 $N_{ber.}$ 8,27% $N_{gef.}$ 8,35%

Einwaage: 4,240mg $V_{korr.}$: 0,324 ccm (24°, 732 Torr)

ɣ-Glu-leu-leu-leu

3g (3,55 mMol) Cbo-α-bz-ɣ-leu-leu-leu-pNB wurden wie bei ɣ-Glu-leu-leu in Methanol/Eisessig hydriert und auf dieselbe Weise aufgearbeitet.

Ausbeute: 0,9g = 52% Schmp. 195-197° Zers.

$C_{23}H_{42}N_4O_7$ 486,6 $N_{ber.}$ 11,50% $N_{gef.}$ 11,35%

Einwaage: 4,061mg $V_{korr.}$: 0,424 ccm (29,5°, 732 Torr)

Gly-gly-leu-leu

Cbo-gly-gly-leu-leu-pNB

3,9g (10 mMol) Cbo-gly-gly-pNP wurden in 50 ccm Chloroform suspendiert und mit einer Lösung von 1,4 ccm Triäthylamin und 4,6g Leu-leu-pNB HBr in 40 ccm Chloroform versetzt. Es entstand rasch eine klare Lösung. Zur Neutralisation überschüssigen Triäthylamins wurden einige Tropfen Eisessig zugefügt und die Mischung dann 2 Tage bei Zimmertemperatur belassen. Übliche Aufarbeitung ergab ein braunes Öl, das in Essigester gelöst

und bis zur Trübung mit Petroläther versetzt wurde. Die zunächst ölige Abscheidung kristallisierte im Kühlschrank. Zweimalige Umkristallisation aus Essigester/Petroläther.

Ausbeute: 5,2g = 83% Schmp. 98-100°

$C_{\ldots}H_{\ldots}N_5O_9$ 627,6 $N_{ber.}$ 11,16% $N_{gef.}$ 11,2%

Einwaage: 3,617mg $V_{korr.}$: 0,364 ccm (26,5°, 735 Torr)

Gly-gly-leu-leu

3,5g (5,8 mMol) Cbo-gly-gly-leu-leu-pNB wurden wie üblich in Methanol Eisessig hydriert und aufgearbeitet.

Ausbeute: 1,75g = 88% Schmp. 234-236° Zers.

$C_{16}H_{30}N_4O_5$ 358,4 $N_{ber.}$ 15,61% $N_{gef.}$ 15,6%

Einwaage: 3,55[illegible]mg $V_{korr.}$: 0,[illegible]00 ccm (2[illegible],5°, 735 Torr)

Gly-leu-leu-leu

Cbo-gly-leu-leu-leu-pNB

6,8g (20 mMol) Cbo-gly-pNP wurden in 100 ccm Chloroform mit 20 mMol leu-leu-leu-pNB (aus 11,5g Hydrobromid und 2,8 ccm Triäthylamin) umgesetzt. Nach 2 Tagen bei Zimmertemperatur wurde wie üblich aufgearbeitet. Der ölige Rückstand wurde in Essigester gelöst und bis zur Trübung mit Petroläther versetzt.

Der p-Nitrobenzylester kristallisierte rasch. Zweimalige Umkristallisation aus Essigester.

Ausbeute: 10,4g = 76% Schmp. 162-164°

$C_{35}H_{49}N_5O_9$ 683,7 $N_{ber.}$ 10,24% $N_{gef.}$ 10,35%
Einwaage: 3,579mg $V_{korr.}$: 0,334 ccm (26,5°, 733 Torr)

Gly-leu-leu-leu

5,9g (8,5 mMol) Cbo-gly-leu-leu-leu-pNB wurden in Methanol/Eisessig hydriert und wie üblich aufgearbeitet. Umkristallisation aus viel 80% Alkohol. Feine verfilzte Nadeln.

Ausbeute: 2,9g = 82% Schmp. 248-250° Zers.

$C_{20}H_{38}N_4O_5$ 414,5 $N_{ber.}$ 13,51% $N_{gef.}$ 13,6%
Einwaage: 4,550mg $V_{korr.}$: 0,560 ccm (24,5°, 732 Torr)

Leu-leu-leu-leu

Cbo-leu-leu-leu-leu-pNB

3,9g (10 mMol) Cbo-leu-pNP und 10 mMol Leu-leu-leu-pNB (aus 5,8g Hydrobromid und 1,4 ccm Triäthylamin in Chloroform) wurden 2 Tage bei Zimmertemperatur in Chloroform umgesetzt. Übliche Aufarbeitung ergab ein Öl, das aus Essigester/Petroläther kristallisierte.

Ausbeute: 6,4g = 86,5% Schmp. 186-188°

$C_{39}H_{57}N_5O_9$ 739,85 $N_{ber.}$ 9,47% $N_{gef.}$ 9,4%
Einwaage: 3,322mg $V_{korr.}$: 0,278 ccm (24°, 743 Torr)

Leu-leu-leu-leu

1,5g (2 mMol) Cbo-leu_4-pNB wurden in Methanol/ Eisessig hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde zur Trockne verdampft und der gelbe Rückstand in absol. Alkohol suspendiert und abfiltriert. Amorphes, in Wasser unlösliches Pulver.

Ausbeute: 0,6g = 64% Schmp. 305-310° Zers.

$C_{24}H_{46}N_4O_5$ 470,6 $N_{ber.}$ 11,88% $N_{gef.}$ 11,75%
Einwaage: 3,557mg $V_{korr.}$: 0,379 ccm (23°, 727 Torr)

3. Enzymatische Abbauversuche

Jeweils 0,01 mMol des zu untersuchenden Peptids wurde in 0,5 ccm Enzym-Pufferlösung bzw. in 0,5 ccm Serum gelöst und in einem geschlossenen Gefäß über verschiedene Zeiträume (5 Min. bis 20 Stdn.) in einem Ultra-Thermostaten bei 38° inkubiert. Es wurde jeweils nach bestimmten Zeitabständen eine Probe zur Chromatographie entnommen. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde sofort nach Auftragen der Probe auf Chromatographiepapier im Trockenschrank auf 120° erhitzt.

Enzym-Pufferlösungen:

1mg Trypsin (C.F.Boehringer, Mannheim) in 10 ccm Phosphatpuffer pH 8

1mg α-Chymotrypsin (C.F.Boehringer, Mannheim) in 10 ccm Phosphatpuffer pH 8

2,5mg Pepsin (Nutritional Biochem. Corp. Cleveland, Ohio) in 10 ccm Biphthalatpuffer pH 3

20mg Leucinaminopeptidase (technisch, A.Hedinger, Stuttgart) in 10 ccm Phosphatpuffer pH 8

10mg Pronase (B-grade, California Corp. for Biochem. Research, Los Angeles) in 10 ccm Phosphatpuffer.

10mg Papain (Nutritional Biochem. Corp. Cleveland, Ohio) in 10 ccm Phosphatpuffer pH 7,5

10mg Ficin (Nutritional Biochem. Corp. Cleveland, Ohio) in 10 ccm Phosphatpuffer pH 7

Papain und Ficin sind SH-Enzyme und als solche leicht oxydierbar und empfindlich gegen Metallionen. Zur Aktivierung wurde daher mit Komplexon III (0,001m) und Cystein HCl H_2O (0,005m) 1/2 Std. vorinkubiert.

Leucinaminopeptidase wurde durch Magnesiumionen (0,005m) aktiviert.

Die Aktivität von Trypsin, Papain und Ficin wurde an Benzoyl-arginin-amid, die von Leucinaminopeptidase an Leu-gly geprüft.

Serum: Frisches Menschen- bzw. Kaninchenblut wurde über Nacht bei +4° im Kühlschrank aufbewahrt, danach zentrifugiert und das überstehende Serum vorsichtig abpipettiert.

4. Chromatographie

Chromatographiert wurde aufsteigend auf Papier der Firma Schleicher&Schüll in Butanol:Eisessig:Wasser 4:1:1. Dieses Lösungsmittelsystem besitzt für die eingesetzten Peptide und die beim Abbau daraus entstehenden Bruchstücke ein ausgezeichnetes Trennvermögen. So lassen sich Leucin, Leu-gly, Leu-leu und Leu-leu-leu ohne weiteres trennen.

Peptide, die dieselbe Aminosäurezusammensetzung aufweisen, z. B. Gly-leu und Leu-gly oder Leu-gly-gly und Gly-gly-leu, wandern nahezu gleichweit. Häufig läßt sich jedoch in einem solchen Falle an der Farbe des Fleckes, die beim Besprühen mit Ninhydrin entsteht, eine Unterscheidung treffen. Peptide mit aminoendständigem Leucin werden sofort violett, Peptide mit aminoendständigem Glycin oder Serin werden zuerst gelb, nach einiger Zeit jedoch ebenfalls blauviolett. Aminoendständiges Histidin kommt sofort blauviolett, Glutaminsäure rotviolett, ß-Alanin rein kornblumenblau. Die verschiedenen Farbnuancen kommen durch Sekundärreaktion der bei der Farbbildung entstehenden Aldehyde mit dem eigentlichen Farbstoff zustande.

Schmelzpunkte: Sämtliche Schmelzpunkte wurden auf einem Gerät nach Dr. Tottoli (Fa. Büchi, Flawil) bestimmt und sind nicht korrigiert.

VIII Zusammenfassung

Die folgenden Peptide wurden synthetisiert:

Leu-his	Gly-gly-phe	ß-Ala-leu-leu
His-leu	Gly-gly-val	ß-Ala-leu-leu-leu
Leu-leu-his	Leu-leu-val	α-Glu-leu-leu
His-leu-leu	Val-leu-leu	α-Glu-leu-leu-leu
Leu-his-leu	Leu-val-leu	γ-Glu-leu-leu
His-his-leu	Ser-leu-leu	γ-Glu-leu-leu-leu
His-leu-his	D-Leu-leu-leu	Gly-gly-leu-leu
	Leu-leu-D-leu	Gly-leu-leu-leu
		Leu-leu-leu-leu

Als Aminoschutzgruppe wurde ausschließlich der Cbo-Rest, als Carboxylschutzgruppe hauptsächlich p-Nitrobenzylester und in einigen Fällen Benzylester verwendet. Die freien Peptide wurden durch Hydrieren der Cbo-benzyl- bzw. -p-nitrobenzylester gewonnen.

Sämtliche aufgeführten, sowie alle in der Diplomarbeit synthetisierten Peptide und einige käufliche Peptide wurden mit Serum, Leucinaminopeptidase, Pepsin, Chymotrypsin, Trypsin, Papain, Ficin, Pronase und 10n HCl abgebaut. Die Ergebnisse des Abbaus werden ausführlich diskutiert, vor allem im Hinblick auf die Stabilität von Peptidwirkstoffen im Blut und auf potentielle Schutzmechanismen für Peptide gegen die Aminopeptidasen des Serums. Die Ergebnisse liefern eine Erklärung für die Stabilität zellvertrauter Peptide (Anserin, Carnosin, Glutathion), da synthetische Peptide mit aminoendständigem ß-Alanin oder aminoendständiger γ-Glutamylbindung praktisch serumfest sind.

IX Literaturverzeichnis

(1) E.Abderhalden, B.Oppler
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.53,294(1907)
(2) E.Abderhalden, L.Pincusson
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.61,200(1909)
(3) C.Oppenheimer
Die Fermente und ihre Wirkung Bd.2,S.878
(4) W.Graßmann, W.Heyde
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.188,69(1930)
(5) G.A.Fleisher
J.biol.Chem. 205,925(1953)
J.biol.Chem. 206,637(1953)
(6) H.Hanson, M.Wenzel
Naturwissenschaften 39,403(1952)
(7) H.Hanson, R.J.Haschen
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.310,221(1958)
(8) D.Klaus, H.Kaffarnik, H.Pfeil
Klin.Wschr. 41,376(1963)
(9) U.J.Lewis, E.H.Thiele
J.Amer.chem.Soc. 79,755(1957)
(10) U.Weber Diplomarbeit Tübingen 1962
(11) N.M.Green, H.Neurath in "The Proteins",Vol.II,pt.B
(12) M.Bodanszky Nature 175,685(1955)
(13) M.Bodanszky, V.DuVigneaud
J.Amer.chem.Soc. 81,5688(1959)
(14) R.Schwyzer Liebigs Ann.Chem. 655,189(1962)
(15) R.Schwyzer, B.Iselin Helv.chim.Acta 43,1760(1960)
(16) T.Wieland Liebigs Ann.Chem. 572,190(1951)
(17) R.A.Boissonas Helv.chim.Acta 34,874(1951)
(18) J.R.Vaughan J.Amer.chem.Soc. 73,3547(1951)
(19) J.R.Vaughan J.Amer.chem.Soc. 74,676(1952)
(20) E.Schnabel Liebigs Ann.Chem. 659,168(1962)
(21) J.C.Sheehan, G.P.Hess
J.Amer.chem.Soc. 77,1067(1955)
(22) J.McLaren Austr.J.Chem. 11,360(1958)

(23) H.Schwarz, K.Arakawa
J.Amer.chem.Soc. 81,5691(1959)
(24) J.E.Shields, W.H.McGregor,F.H.Carpenter
J.org.Chemistry 26,1491(1961)
(25) R.W.Holley, E.Sondheimer
J.Amer.chem.Soc. 76,1326(1954)
(26) R.F.Fischer, R.R.Whetstone
J.Amer.chem.Soc. 76,5076(1954)
(27) E.Klieger, H.Gibian
Liebigs Ann.Chem. 655,195(1962)
(28) G.Losse, H.Jeschkeit, W.Langenbeck
Chem.Ber. 96, 204(1963)
(29) J.S.Fruton, J.I.Harris
J.biol.Chemistry 146,463(1942)
J.biol.Chemistry 191, 143(1951)
(30) E.L.Smith, H.Hanson
J.biol.Chemistry 175, 833(1948)
(31) E.L.Smith, D.H.Spackman, W.J.Polgase
J.biol.Cheistry 199,801(1952)
(32) E.L.Smith, D.H.Spackman
J.biol.Chemistry 212,271(1955)
(33) M.M.Nachlas, T.P.Goldstein, A.M.Seligman
Arch.Biochem.Biophysics 97,223(1962)
(34) R.L.Hill, E.L.Smith
J.biol.Chemistry 224,209(1957)
(35) H.O.Calvery J.biol.Chemistry 102,73(1933)
(36) M.Bergmann, J.S.Fruton
Advances in Enzymol. 1,63(1941)
(37) C.A.Dekker, S.P.Taylor, J.S.Fruton
J.biol.Chemistry 180,155(1949)
(38) J.R.Kimmel, E.L.Smith
J.biol.Chemistry 207,515(1954)
(39) H.O.VanOrden, E.L.Smith
J.biol.Chemistry 208,751(1954)
(40) N.C.Davis J.biol.Chemistry 223,935(1956)
(41) H.Tuppy, U.Wiesbauer, E.Wintersberger
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.329,278(1962)

(42) M.Bergmann, H.Fraenkel-Conrat
J.biol.Chemistry 119,707(1937)
(43) J.S.Fruton Yale J.Biol.and Med. 22,263(1950)
(44) R.B.Johnston, M.J.Mycek, J.S.Fruton
J.biol.Chemistry 185,629(1950)
(45) A.C.Johnson, R.M.Herriott
J.biol.Chemistry 222,855(1956)
(46) P.Desnuelle Enzymes Bd.4,S.94
(Boyer,Lardy,Myrbäck Academic Press New York)
(47) G.W.Irving, J.S.Fruton, M.Bergmann
J.biol.Chemistry 138,231(1941)
(48) B.R.Hammond, H.Gutfreund
Biochem.J. 72,349(1959)
(49) R.B.Johnston, M.J.Mycek, J.S.Fruton
J.biol.Chemistry 187,205(1950)
(50) M.Nomoto, Y.Narahashi
J.Biochemistry(Tokyo) 46,653,839,1481(1959)
(51) M.Nomoto, Y.Narahashi
J.Biochemistry(Tokyo) 48,593,906(1960)
(52) V.DuVigneaud J.biol.Chemistry 108,753(1935)
(53) H.K.Miller, H.Waelsch
J.Amer.chem.Soc. 74,1092(1952)
(54) S.Guttmann, R.A.Boissonas
Helv.chim.Acta 41,1852(1958)
(55) J.S.Fruton, M.Bergmann
J.biol.Chemistry 127,627(1939)
(56) M.Bergmann, J.S.Fruton
Advances in Enzymol. 1,63(1941)
(57) C.R.Harrington, R.V.Pitt-Rivers
Biochem.J. 38,417(1944)
(58) A.A.Plentl, I.H.Page
J.biol.Chemistry 163,49(1946)
(59) C.A.Dekker, S.P.Taylor
J.biol.Chemistry 180,155(1949)
(60) E.J.Casey, K.J.Laidler
J.Amer.chem.Soc. 72,2159(1950)
(61) L.E.Baker J.biol.Chemistry 193,809(1951)

(62) G.E.Perlmann Arch.Biochem.Biophysics 65,210(1956)
(63) J.Goldstein, W.Konigsberg, R.J.Hill
J.biol.Chemistry 238,2028(1963)
(64) H.Zuber Chimia 14,405(1960)
(65) J.S.Fruton J.biol.Chemistry 146,463(1942)
(66) N.M.Green, H.Neurath
in "The Proteins" Vol.II,PartB,S.1057
(67) N.Izumiya, T.Yamashita
J.Biochemistry 46,19,337,991(1959)
J.Biochemistry 48,651(1960)
(68) P.Desnuelle Biochim.biophysica Acta 23,608(1957)
(69) M.Brenner Helv.chim.Acta 33,568(1950)
(70) D.T.Gish Biochim.biophysica Acta 35,557(1959)
(71) R.L.M.Synge Biochem.J. 39,351(1945)
(72) L.Lawrence, W.I.Moore
J.Amer.chem.Soc. 73,3973(1951)
(73) E.F.Hammel, S.Glasstone
J.Amer.chem.Soc. 76,3741(1954)
(74) J.R.Whitaker, F.E.Deatherage
J.Amer.chem.Soc. 77,3360(1955)
(75) J.I.Harris, R.D.Cole, N.G.Pon
Biochem.J. 62,154(1956)
(76) W.Kern, B.Scherhag
Makromolekulare Chem. 28, 209(1958)
(77) D.A.Long, J.E.Lillycrop
Trans.Faraday Soc. 59,907(1963)
(78) M.L.Bender, R.D.Ginger, K.C.Kemp
J.Amer.chem.Soc. 76,3350(1954)
(79) M.L.Bender, R.D.Ginger
J.Amer.chem.Soc. 77,348(1955)
(80) D.A.Long, T.G.Truscott
Trans.Faraday Soc. 59,918,1833,2316(1963)
(81) R.Hirohata
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.295,368(1953)
(82) K.Heyns, H.F.Grützmacher
Liebigs Ann.Chem. 609,209,224(1957)

(83) K.Heyns, H.F.Grützmacher
Liebigs Ann.Chem. 642,174(1961)
(84) S.Goldschmidt, C.Jutz
Chem.Ber. 86,1116(1953)
(85) J.R.Vaughan, J.A.Eichler
J.Amer.chem.Soc. 75,5556(1953)
(86) S.W.Fox, M.Fling
J.Amer.chem.Soc. 72,1862(1950)
(87) M.Bodanszky, V.DuVigneaud
J.Amer.chem.Soc. 81,5688(1959)
(88) T.B.Paiva, A.C.M.Paiva, H.A.Scheraga
Biochemistry 2,1327(1963)

Lebenslauf

Am 2. Juni 1937 wurde ich, Ulrich Weber, als Sohn des Kaufmanns Ludwig Weber und seiner Ehefrau Alwine geb. Junger in Tübingen geboren. Meine Kindheit verbrachte ich in Reutlingen. Hier besuchte ich auch 4 Jahre die Volksschule und anschließend 9 Jahre lang das Friedrich-List-Gymnasium und legte im Februar 1956 die Reifeprüfung ab. Im Sommer 1956 begann ich an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen mit dem Chemiestudium. 1959 legte ich hier die Diplom-Vorprüfung und 1961 die Diplom-Hauptprüfung ab. Von 1961-1964 fertigte ich unter Anleitung von Herrn Professor Dr.Dr. G. Weitzel im physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen eine Diplomarbeit und anschließend eine Doktorarbeit an.

Meine akademischen Lehrer waren folgende Herren Professoren und Dozenten

Physiologische Chemie:	E.Buddecke, F.Schneider, G.Weitzel
Anorganische Chemie:	K.Brodersen, W.Rüdorff
Organische Chemie:	H.Hellmann, E.Müller, G.Opitz, G.Wittig
Physikalische Chemie:	G.Kortüm, H.Mauser
Physik:	H.Krüger, G.Mack, G.Möllenstedt, R.Mühleisen
Mineralogie:	W.v.Engelhardt, S.Haussühl K.Spangenberg
Mathematik:	W.Schweizer